

**VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN
VON TRISETUM FLAVESCENS,
CHOLECALCIFEROL UND
1,25-DIHYDROXYCHOLECALCIFEROL
AN HÜHNERKÜKEN**

Peter Bittner

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551912_0012

Aus dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie
und Ernährungsphysiologie
(Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker)
des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN VON TRISETUM FLAVESCENS,
CHOLECALCIFEROL UND 1,25-DIHYDROXYCHOLECALCIFEROL
AN HÜHNERKÜKEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Peter Bittner
aus
Oettingen

München 1979

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Kräußlich

Referent: Prof. Dr. H. Zucker

Korreferent: Prof. Dr. G. Dirksen

Tag der Promotion: 23. Februar 1979



Meiner Frau

Inhaltsübersicht

1. Einleitung	3
2. Literaturübersicht	6
2.1. Der Vitamin-D ₃ -Stoffwechsel	6
2.2. Der Calcium-Phosphor-Stoffwechsel des Hühnerküken	8
2.3. Experimentelle Untersuchungen zur Strontiumhemmung	10
2.4. Experimentelle Untersuchungen zur EHDP-Hemmung	12
3. Bisherige Ergebnisse der Trisetumforschung und Problemstellung	14
4. Eigene Untersuchungen	17
4.1. Methodik	17
4.2. Tierhaltung	19
4.3. Fütterung	19
4.4. Herkunft und Verwendung der unterschiedlichen Diätvariablen	23
4.5. Neue Blutnahmetechnik bei Küken	24
4.6. Bestimmungsmethoden der untersuchten Parameter	25
4.6.1. Bestimmung des anorganischen Phosphors im Serum	25
4.6.2. Bestimmung des Calciums und Strontiums im Serum	26
4.6.3. Bestimmung des CaBP in der Dünndarmmukosa	28
4.6.4. Bestimmung des Asche- und Calciumgehaltes der Tibia	29
4.6.5. Bestimmung der Chlortetracyclinmarkierung der Tibia	30
4.7. Statistik	33
5. Versuchsanordnung und Ergebnisse	34
5.1. Versuch I	34
5.1.1. Versuchsdurchführung	34
5.1.2. Ergebnisse	35

5.2. Versuch II	41
5.2.1. Versuchsdurchführung	41
5.2.2. Ergebnisse	42
5.3. Versuch III	46
5.3.1. Versuchsdurchführung	46
5.3.2. Ergebnisse	47
5.4. Versuch IV	51
5.4.1. Versuchsdurchführung	51
5.4.2. Ergebnisse	52
5.5. Versuch V	56
5.5.1. Versuchsdurchführung	56
5.5.2. Ergebnisse	58
5.6. Versuch VI	63
5.6.1. Versuchsdurchführung	63
5.6.2. Ergebnisse	65
6. Diskussion	73
6.1. Gesamtergebnis des biologischen Vergleiches von Goldhafer, Vitamin D ₃ und 1,25-(OH) ₂ D ₃	73
6.2. Eignung der Serumwerte als Nachweis der Strontium- oder EHDP-Hemmung	77
6.3. Eignung von Strontium und EHDP in Kükenversuchen zur Untersuchung der Trisetumaktivität	78
6.4. Vergleichende Beurteilung von Broiler- und Leghornküken	80
6.5. Aussagekraft der Chlortetracyclinmarkierung	81
7. Zusammenfassung	83
8. Summary	85
9. Literaturverzeichnis	87

1. Einleitung

Seit Anfang der 60er Jahre wird in bayerischen und österreichischen voralpinen Grünlandbetrieben eine chronisch verlaufende Rindererkrankung beobachtet, die in Deutschland als "enzootische Kalzinose" und in Österreich als "Weidekrankheit" bezeichnet wird (DIRKSEN G., 1969; LI-BISELLER und GUNHOLD, 1969).

Die Symptome äußern sich klinisch in starker Abmagerung, Rückgang der Milchleistung, vermehrtem Liegen und Bewegungsstörungen (DIRKSEN et al., 1970; KÖHLER H., 1977). Dabei ist vor allem die Vorbiegieigkeit der Vordergliedmaßen am Karpus, der aufgekrümmte Rücken und das sogenannte Trippeln, eine ständig wechselnde Be- und Entlastung der Gliedmaßen, auffällig. Auch das Aufstehen bereitet offensichtlich Schmerzen, da die Tiere dabei längere Zeit auf den Karpalgelenken verharren. Die Serumwerte von anorganischem Phosphat und von Calcium sind stark erhöht bzw. an der oberen physiologischen Grenze.

Pathologisch-anatomisch sind ausgedehnte Verkalkungen des Endokards, der großen Gefäßstämme, der Lunge und der Beugesehnen nachweisbar (HÄNICHEN et al., 1970; KÖHLER et al., 1974; KÖHLER H., 1977).

Histologisch läßt sich eine Osteomyelosklerose feststellen, die durch vermehrte Neubildung von Knochengewebe entsteht (DÄMMRICH et al., 1970).

Das klinische und pathologisch-anatomische Erscheinungsbild ähnelt sehr stark einer in Argentinien (WORKER and CARRILLO, 1967) und Brasilien (DÖBEREINER et al., 1975) vorkommenden Rindererkrankung und zeigt weitgehend Übereinstimmung mit einer in Florida bekannten Kalzinose, die dort Pferde und Rinder befallen kann (KROOK et al., 1975 a; KROOK et al., 1975 b). Die "Enteque seco" in Ar-

gentinien und die "Espichamento" in Brasilien lassen sich auf den Verzehr der Pflanze *Solanum malacoxylon* Sendtner zurückführen. *Cestrum diurnum*, ebenfalls ein Nachtschattengewächs, verursacht die Kalzinose in Florida. Da keine dieser Pflanzen im Alpenvorland heimisch ist, versuchte man durch systematische Untersuchungen die Ätiologie der enzootischen Kalzinose zu klären (DIRKSEN et al., 1970; KÖHLER und LIBISELLER, 1970).

Nach selektiver Verfütterung von Klee, Gräsern oder Kräutern wies nur das mit Gras gefütterte Schaf die für die Kalzinose typischen Verkalkungen der Aorta auf (DIRKSEN et al., 1971). Da im Bewuchs der fraglichen Wiesen Goldhafer und Knautgras am stärksten vertreten waren, konzentrierte sich der Verdacht auf diese beiden Pflanzenarten. Tatsächlich konnte bei Kaninchen und Schafen die kalzinogene Wirkung des Goldhafers (*Trisetum flavescens*) nachgewiesen werden (DIRKSEN et al., 1972; DIRKSEN et al., 1973; DIRKSEN et al., 1974), die schließlich von österreichischer Seite bestätigt wurde (LIBISELLER et al., 1974).

Weil man Goldhafer als wichtigstes Gras der Bergfettwiesen schätzte (STÄHLIN A., 1969), wurde nach der Ursache und der Beeinflussung des kalzinogenen Faktors gesucht.

Da bekanntlich der tierische Organismus unter dem Einfluß des Sonnenlichtes (UV-Anteil) das Vitamin D₃ (Cholecalciferol) aus dem in frischen Pflanzen enthaltenen Provitamin D₃ (7-Dehydrocholesterin) bildet, dachte man an diesen ursächlichen Zusammenhang. Doch eine UV-Bestrahlung der Tiere beeinflusste die *Trisetum*-aktivität nicht (DIRKSEN et al., 1975; Wolf M., 1976). Es zeigte sich ferner, daß weder Flachlandbedingungen (DIRKSEN et al., 1974) noch Düngung (PLANK et al., 1976) diese Noxe zu ändern vermochten.

Außerdem konnte weder durch den Silierungsprozeß (HEINRITZI et al., 1977), noch durch künstliche oder natürliche Trocknung des Goldhafers (WOLF und DIRKSEN, 1976) dessen wirksame Substanz zerstört werden.

Die durch *Trisetum flavescens* hervorgerufene anormal starke Ablagerung von Calciumsalzen in Körpergeweben entspricht weitgehend den Verkalkungen, wie sie bei übermäßiger Versorgung der Tiere mit Vitamin D₃ beobachtet werden (CAPEN et al., 1966; PETRIE and BREEZE, 1977). Es liegt deshalb die Vermutung nahe, daß Goldhafer eine dem Vitamin D ähnliche Substanz enthält. Um den Wirkungsmechanismus dieses Vitamins besser verstehen zu können, ist eine kurze Darstellung des Cholecalciferolstoffwechsels angebracht.

2. Literaturübersicht

2.1. Der Vitamin-D₃-Stoffwechsel

Nach den historischen Erkenntnissen über das antirachitische Vitamin D (WINDAUS et al., 1936) gelang erst in neuerer Zeit durch die Entwicklung radioaktiver, chromatographischer und massenspektrometrischer Meßmethoden der Einblick in den Stoffwechsel dieses Vitamins. Die Vermutung, daß ein Metabolismus vorliegen könnte (CARLSSON et al., 1952), wurde durch die Isolierung eines polaren Metaboliten bestätigt (BLUNT et al., 1968; PONCHON and DELUCA, 1969). Diese Substanz war aktiver als die ursprüngliche und konnte als 25-Hydroxycholecalciferol (25-OH-D₃) identifiziert und schließlich synthetisiert werden (BLUNT and DELUCA, 1969). Die Hydroxylierung findet hauptsächlich in den Lebermikrosomen statt (PONCHON et al., 1969; HORSTING and DELUCA, 1969; BHATTACHARYYA and DELUCA, 1974). Schließlich gelang der Nachweis, daß nur in der Niere ein weiterer Hydroxylierungsschritt stattfindet (LAWSON et al., 1969; FRASER and KODICEK, 1970), dessen Produkt eindeutig als 1,25-Dihydroxycholecalciferol (1,25(OH)₂D₃) bestimmt werden konnte (LAWSON et al., 1971; HOLICK et al., 1971).

Diese Substanz induziert in den Darmepithelzellen die Bildung eines spezifischen Proteins, das als Calcium-bindendes Protein (CaBP) bezeichnet wird (EMTAGE et al., 1973; ZERWEKH et al., 1974; HAUSSLER M. R., 1975) und für die Resorption von Calcium aus dem Darmtrakt verantwortlich ist (EBEL et al., 1969). Aufgrund dieser Eigenschaft wird 1,25(OH)₂D₃ als aktiver Metabolit des Vitamin D₃ mit Hormoncharakter bezeichnet. Auch die Resorption von Phosphat wird durch Cholecalciferol (Vitamin D₃)

im Dünndarm erhöht. Diese ist von der Konzentration an Calciumionen unabhängig (CARLSSON A., 1954; PETERLIK and WASSERMAN, 1978).

Neben dem Intestinum werden die Knochen als zweites Zielorgan angesehen, in denen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Mineralisierung und Mobilisierung von Calcium am wirksamsten fördert (HOLICK, 1972 a; NORMAN and HENRY, 1974; BORLE A. B., 1974) und somit auch von dieser Seite her die Calcium- und Phosphatwerte im Serum reguliert (TANAKA and DELUCA, 1974; RAMP et al., 1974; STEELE et al., 1975).

Die Metabolisierung des Vitamin D_3 erfolgt nicht unkontrolliert, sondern wird im wesentlichen von der 25-Hydroxycholecalciferol- 1α -Hydroxylase in den Nierenmitochondrien gesteuert. Die Aktivität dieses Enzyms läßt sich durch Mangeldiäten an Calcium, Phosphor, Vitamin D_3 , $25(\text{OH})\text{D}_3$ oder $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ steigern bzw. durch deren übermäßige Verabreichung unterdrücken (TANAKA and DELUCA, 1973; EVANS et al., 1975; BAXTER and DELUCA, 1976; OMDAHL and DELUCA, 1977; COLSTON et al., 1977; SOMMERVILLE et al., 1978).

Ebenso soll das Parathormon die Synthese von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimulieren, wobei unterschiedliche Auffassungen über die Art der Steuerung bestehen (TANAKA and DELUCA, 1973; FRASER and KODICEK, 1973; GALENTE et al., 1973; BORLE A. B., 1974; KOLATA G. B., 1975; GONNERMAN et al., 1975; OMDAHL et al., 1977).

Über die Wirkung des Calcitonins, dem Gegenspieler des Parathormons, bestehen noch gegensätzliche Meinungen (GALENTE et al., 1972; RASMUSSEN et al., 1972).

Eine Aktivitätssteigerung der 1α -Hydroxylase kann auch durch Oestrogen- bzw. Prolactingaben erzielt werden (TANAKA et al., 1976; SPANOS et al., 1976).

Wird dem Organismus in unphysiologischer Weise viel Calcium, Strontium oder eine Organophosphonsäure zugeführt, so wird in der Niere die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese unterdrückt

und stattdessen vermehrt $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gebildet (BOYLE et al., 1971; HOLICK et al., 1972 b; TAYLOR et al., 1975; OMDAHL and DELUCA, 1977; OMDAHL and EVAN, 1977). Dieser Metabolit ist nicht so wirksam wie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und fördert in hoher Konzentration mehr den intestinalen Calciumtransport als die Mobilisierung von Knochencalcium (BOYLE et al., 1973; HENRY et al., 1976). Auch für den ungestörten Schlupf bei Küken ist $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ von Bedeutung (HENRY and NORMAN, 1978). Ob der Folgemetabolit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ lediglich eine Schutzfunktion des Körpers vor einer Calciumüberladung darstellt, bleibt noch zu klären (HOLICK et al., 1973 a).

Wie wichtig die bisherigen und weitere Erkenntnisse über den Vitamin-D-Stoffwechsel sind, läßt sich aus der klinischen Anwendung von $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder dem billigeren Syntheseanalog $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ bei Mensch und Tier er-messen (HOLICK et al., 1973 b; DELUCA H. F., 1974; TOFFOLON et al., 1975; BRICKMAN et al., 1975; SACHS et al., 1977). Denn diese Substanzen sind sofort im Calciumstoffwechsel aktiv und benötigen dazu nicht das Nierenenzym 1α -Hydroxylase, deren Aktivität beispielsweise bei der renalen Osteodystrophie stark beeinträchtigt ist.

2.2. Der Calcium-Phosphor-Stoffwechsel des Hühnerkükens

Die Resorption von Calcium findet bei Küken im Duodenum, Jejunum und Ileum, die von Phosphat hauptsächlich im oberen Jejunum statt (HURWITZ and BAR, 1970). Beide Transportvorgänge sind auf der Mukosaseite energieabhängig und werden durch Vitamin D oder seine Metaboliten gefördert (CORRADINO R. A., 1973; TAYLOR A. N., 1974; RIZZOLI et al., 1977; PETERLIK and WASSERMAN, 1978). Entgegen früheren Untersuchungen scheint der Phos-

phattransport nicht von der Gegenwart der Calciumionen abhängig zu sein.

Nach neueren in vitro Ergebnissen wird sogar Phosphor noch vor Calcium vom Darmtrakt aufgenommen und soll von einer gewissen Konzentration an auf den Calciumtransport nicht mehr stimulierend wirken (HEGSTED et al., 1978). Dieser Mechanismus könnte die Hypocalcämie erklären, die bei einer Calciummangeldiät mit gleichzeitigem Phosphorüberschuß entsteht (THORNTON P. A., 1974).

Im Gegensatz zu Säugern ist die Hypocalcämie, die bei Vitamin D-freier Fütterung entsteht, nicht mit einer Hypophosphatämie, sondern mit einer Hyperphosphatämie gekoppelt (CHEN and BOSMANN, 1964; WASSERMAN and TAYLOR, 1973; RAMP et al., 1974; GONNERMAN et al., 1975). In diesem Falle wird eine mangelhafte Sekretion des Parathormons diskutiert, die durch das fehlende Vitamin D₃ erklärt wird.

Dieses Parathormon, das bei Küken im Vergleich zu Säugetieren schneller und kürzer wirken soll (TAYLOR T. G., 1971), erfüllt am Knochen und der Niere die bekannten Aufgaben: es aktiviert die Osteoklasten und erhöht die renale Phosphatausscheidung. Dadurch wird im Serum der Calciumspiegel erhöht und die Phosphatkonzentration erniedrigt. Durch Parathyreoidektomie können die umgekehrten Effekte erzielt werden (STURKIE P. D., 1965).

Bei Vögeln wird im Ultimobranchialen Körper das Hormon Calcitonin gebildet, das bei Säugern in den C-Zellen der Schilddrüse synthetisiert wird und als Antagonist des Parathormons in den Mineralstoffwechsel eingreift (SIMKISS and DACKE, 1971). Obwohl Versuche mit Calcitoninabgaben bei Vögeln kaum meßbare Ergebnisse liefern, wird der gleiche Wirkungsmechanismus wie bei den Säugern angenommen: eine Hemmung der Osteoklastentätigkeit bei erhöhtem Calciumspiegel im Serum, welche

eine Senkung der Calcium- und Phosphatwerte im Blut zur Folge hat (KMENT A., 1976). Es gelang sogar, eine Sekretion des Calcitonins in isolierten Epithelkörperchen (Parathyreoidea) von Kükenembryonen nachzuweisen, die überraschenderweise wie die Parathormonfreisetzung mit abnehmender Calciumkonzentration im Kulturmedium anstieg (FEINBLATT et al., 1975).

2.3. Experimentelle Untersuchungen zur Strontiumhemmung

Von Strontium ist schon lange bekannt, daß es bei Ratten zu einer Rachitis führt, die durch Vitamin D₃-Gaben nicht heilbar ist (SOBEL et al., 1934).

Durch systematische Untersuchungen konnte sogar gezeigt werden, daß die Absorption von Strontium in den einzelnen Darmabschnitten unterschiedlich ist und mit dem Alter der Tiere abnimmt (WASSERMAN R. H., 1963; COMAR and WASSERMAN, 1964). Während Ratten Strontium mehr im Ileum absorbieren, nehmen Küken das meiste im Duodenum und Jejunum auf. Niere und Gastrointestinaltrakt scheinen bei Ratten zwischen Sr und Ca unterscheiden zu können, da im Vergleich zu Ca die Ausscheidung von Sr hoch und die Retentionsrate gering ist (BAUER et al., 1955). Beim Kükendarm und Rattenskelett ist diese Fähigkeit nicht zu finden (WASSERMAN R. H., 1962).

Durch 0,4 bis 1,2 % Strontium in der Nahrung wird bei Küken, Ratten und Schweinen die Gewichtszunahme (WEBER et al., 1968; JOHNSON et al., 1968) und die Kalzifizierung der Knochen gehemmt (BARTLEY and REBER, 1961), die Knochenasche nimmt ab und Magnesium- und Kaliumgehalte steigen im Vergleich zu den Kontrolltieren an (JOHNSON A. R., 1973). Durch Strontiumgaben wird, wie CORRADINO

et al. (1971 a) nachweisen konnten, bei Kükentibien die Zone des Epiphysenfugenknorpels verbreitert und deren Mineralisierung gehemmt. Der reduzierte Calciumgehalt der Tibien wird durch Strontium ausgeglichen. Es gelang ihnen auch, eine enge Korrelation zwischen fallenden Calcium- und steigenden Strontiumwerten im Plasma aufzuzeigen. Nach Absetzen der Strontiumdiät besserten sich die verursachten Schäden schon nach drei Tagen (CORRADINO et al., 1971 b).

Da Strontium nahezu im gleichen Umfang absorbiert wird wie Calcium (WASSERMAN R. H., 1962), überraschten die Forschungsergebnisse von INGLERSOLL und WASSERMAN (1971) nicht, die eine hohe Bindungsaffinität des Strontiums an das CaBP beweisen konnten. Während man früher an eine direkte Strontiumwirkung auf die Knochenzellen dachte (SOBEL et al., 1935), glaubte man später an eine ähnliche Hemmung der RNS-Synthese der CaBP-Bildung, wie sie für Actinomycin D bei Küken bekannt war (CORRADINO et al., 1971 a). OMDAHL und DELUCA (1971; 1972) gelang es schließlich, durch umfassende Kükenversuche eine einleuchtende Erklärung der Strontiumwirkung zu finden. Neben einer Hemmung der CaBP-Bildung und der Ca-Absorption (CORRADINO and WASSERMAN, 1970) stellten sie fest, daß strontiumhaltiges Futter bei Küken die Synthese von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Niere unterdrückt. Auch Gaben von Vitamin D_3 oder $25(\text{OH})\text{D}_3$ konnten diese Wirkung nicht überwinden. Erst nach Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurden die CaBP-Bildung und die intestinale Ca-Absorption wiederhergestellt, weil dadurch die Blockade der Hydroxylierung in der Niere umgangen wurde. Damit war der Beweis erbracht, daß Strontium die Metabolisierung von $25(\text{OH})\text{D}_3$ zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in den Nierenmitochondrien hemmt. Statt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wird ein anderer Metabolit in der Niere gebildet, der später als $24,25-$

$-(OH)_2D_3$ identifiziert werden konnte (HOLICK et al., 1972 b).

Auf welche Weise Strontium die Umwandlung von $25(OH)-D_3$ in den Mitochondrien ändert, ist noch ungeklärt. Doch nimmt man neben einer direkten Beeinflussung auch eine indirekte Wirkung an, die durch humorale Faktoren, wie z. B. Parathormon oder Calcitonin, vermittelt werden könnte (OMDAHL and DELUCA, 1972). Für diesen indirekten Effekt sprechen Schweine- und Ziegenversuche, bei denen durch Strontiumgaben die Sekretion des Calcitonins stark angeregt und die des Parathormons gehemmt wurde (BATES et al., 1974; PENTO et al., 1974; CARE et al., 1975).

2.4. Experimentelle Untersuchungen zur EHDP-Hemmung

Seit MORGAN (1971) die Wirkung von Organophosphonsäuren auf den Calciumstoffwechsel nachwies, wurden mit EHDP (Äthan-1-Hydroxy-1,1-Diphosphonat) zahlreiche Versuche zur Untersuchung der Regulation der Calciumabsorption durchgeführt.

So konnte bei Ratten nachgewiesen werden, daß durch hohe subkutane EHDP-Dosen die Knochenmineralisation und die intestinale Calcium- und Phosphorabsorption gehemmt, die Calciumausscheidung über den Harn gesteigert wird (GASSER et al., 1972; TRECHSEL et al., 1977; RIZZOLI et al., 1977). Es gilt nun als gesichert, daß dieser Effekt auf einer Beeinträchtigung der $1,25(OH)_2D_3$ -Synthese beruht, wie es bei Ratten und Küken untersucht wurde (HILL et al., 1973; BAXTER et al., 1974). Unterstützt wird diese Feststellung durch Rattenversuche, in denen durch Verabreichen von $1,25(OH)_2D_3$ die Hemmung der intestinalen Calciumabsorption aufgehoben wurde, während bei sehr hohen Dosen von Vitamin D_3 oder $25(OH)D_3$ sich dieser Effekt

nicht zeigte (BONJOUR et al., 1973; BONJOUR et al., 1975). Wichtig ist es, die Versuche mit hohen EHDP-Dosen durchzuführen. Denn bei geringer Konzentration stimuliert EHDP bei Ratten die Calciumabsorption und die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Anreicherung im Dünndarm (GASSER et al., 1972; GUILLAND et al., 1975).

Die EHDP-Behandlung führt außerdem zu einer Hypercalcämie, einer Hypophosphatämie, einer Reduzierung der Knochenasche, des CaBP und einer verstärkten Bildung des $24,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ (BAR and HURWITZ, 1973; BAXTER et al., 1974; TAYLOR et al., 1975; TRECHSEL et al., 1977).

Das Parathormon scheint, im Gegensatz zu einer Diät mit niedrigem Ca-Gehalt, auf die EHDP-Hemmung bei Ratten keinen ausgleichenden Einfluß zu haben (BONJOUR et al., 1977).

Es konnte eine enge Korrelation zwischen gehemmter Knochenmineralisation, verminderter intestinaler Calciumabsorption und Hypercalcämie festgestellt werden (TRECHSEL et al., 1977). Aufgrund dieser Tatsache wird die reduzierte Calciumabsorption als Folge der gehemmten Knochenmineralisation aufgefaßt. Diese Hypothese wird durch Versuche unterstützt, in denen durch die Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Hemmung der Calciumabsorption, nicht aber die der Knochenmineralisation überwunden wurde (BAXTER et al., 1974; BONJOUR et al., 1975). Der Wirkungsmechanismus von EHDP auf die Reduzierung der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese ist unklar. Es wird ein indirekter Mechanismus angenommen, der den Organismus vor einer Calciumüberladung schützen soll, nachdem die Calciumaufnahme in den Knochen durch EHDP unterbunden wurde (TRECHSEL et al., 1977).

3. Bisherige Ergebnisse der Trisetumforschung und Problemstellung

Wie bereits in der Einleitung gezeigt wurde, ist die von *Solanum malacoxylon* oder *Cestrum diurnum* verursachte Kalzinose der durch *Trisetum flavescens* bedingten vergleichbar. Die Vermutung, daß *S. malacoxylon* einen dem aktiven Metaboliten des Vitamin D_3 ähnlichen Faktor enthält (WASSERMAN R. H., 1974; WALLING and KIMBERG, 1975), konnte durch den Nachweis eines $1,25(OH)_2D_3$ -Glykosids bestätigt werden (HAUSSLER et al., 1976; PETERLIK et al., 1976). Auch bei *Cestrum diurnum* gelang dieser Nachweis (HUGHES et al., 1977). Dieses $1,25-(OH)_2D_3$ beider Pflanzen wird als auslösende Ursache der Kalzinose angesehen, da es nicht mehr einer Hydroxylierung in der Niere unterliegt und somit unter Umgehung dieser Feedback-Regulation ungehindert im Organismus wirken kann.

Es hat nun an Versuchen nicht gefehlt, auch im Goldhafer eine dem Vitamin D ähnliche Verbindung nachzuweisen. WASSERMAN und Mitarbeiter (1977) konnten bei Kükenversuchen eine antirachitische Aktivität des *T. flavescens* feststellen. In ihren Versuchen konnte nur mit einer bestimmten Goldhafer-Charge die durch Strontium induzierte Hemmung der 1α -Hydroxylase teilweise überwunden werden. Deshalb sind ihrer Meinung nach im *Trisetum flavescens*, wenn überhaupt, nur geringe Mengen an $1,25-(HO)_2D_3$ enthalten, die jedoch nicht das aktive Prinzip des Goldhafers darstellen können.

ZUCKER et al. (1977) gelang es, aus lyophilisiertem *T. flavescens* eine biologisch hochaktive Fraktion mit Steroidcharakter zu isolieren. Mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie stellten sie fest, daß diese

aktive Substanz weder mit $25(\text{OH})\text{D}_3$ noch mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ identisch ist. Vielmehr läuft der kalzinogene Faktor parallel bzw. fast parallel mit Vitamin D_3 . Gaschromatographische und massenspektrometrische Untersuchungen bestätigen diesen Befund (RAMBECK and ZUCKER, 1978).

Im Gegensatz dazu vertreten PETERLIK et al. (1977 a; 1977 b) die Auffassung, daß Goldhafer einen dem $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ ähnlichen Wirkstoff enthält und deshalb kalzinogen wirkt. Denn bei ihren Kükenversuchen fördert der aktive Faktor des *Trisetum flavescens* die CaBP-Produktion und den Calcium- und Phosphattransport im Dünndarm, obwohl durch strontiumhaltiges Futter die Synthese von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gehemmt wurde. Diese Autorengruppe konnte außerdem durch die Bestimmung des Eischalentröckengewichtes von Wachteln eine Goldhaferaktivität von rund 22 200 I. E. Vitamin D_3 /kg Trockenmasse feststellen (KÖHLER et al., 1978).

Um diese teilweise widersprüchlichen Ergebnisse besser einsichtig zu machen, wurden die nun folgenden Versuche unternommen. Dabei interessierte es, ob im biologischen Test der kalzinogene *Trisetum*-faktor mehr einem Vitamin D_3 -artigen oder einem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -ähnlichen Effekt zuzuordnen ist.

Um dieses Problem zu lösen, wurden Hemmversuche mit Strontium oder EHDP durchgeführt. Diese Substanzen besitzen die Fähigkeit, bei entsprechender Konzentration die Metabolisierung des Vitamin D_3 im Organismus zu hemmen. Die biologische Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bleibt jedoch uneinflusst.

Mit Hilfe dieses Wirkungsprinzipes der beiden Hemmsubstanzen sollte es möglich sein, den kalzinogenen Faktor des *T. flavescens* zu charakterisieren; denn ver-

hält sich das aktive Prinzip des Goldhafers wie Vitamin D_3 , so wird es wie dieses durch Sr oder EHDP gehemmt. Dies läßt sich dann an den rachitischen Erscheinungen der Versuchstiere erkennen. Unterliegt jedoch der kalzinogene Faktor wie $1,25(OH)_2D_3$ im Organismus keiner weiteren Metabolisierung, so wird er durch die beiden Hemmsubstanzen nicht beeinflußt. In diesem Falle zeigen die Versuchstiere keine rachitischen Symptome.

Da die bisherigen Versuche lediglich mit Leghornküken durchgeführt wurden, bietet sich ein biologischer Vergleich der Trisetumwirkung mit anderen Hybridzuchten, z. B. Broilern, geradezu an. Denn bei einer Hemmung der Trisetumaktivität müßten diese schnellwüchsigen Masthybriden wegen ihres großen Ca-Umsatzes rachitische Erscheinungen viel schneller und drastischer zeigen als die Leghornküken.

Als Kriterien für diese mögliche Hemmbarkeit der Trisetumaktivität dienten die Calcium- und anorganischen Phosphorwerte des Serums.

Auch die Asche- und Calciumgehalte der Tibien wurden zum Nachweis rachitischer Erscheinungen bestimmt.

Außerdem wurden bei jedem Versuch der Futterverzehr, die Gewichtsentwicklung und die Mortalität für jede Versuchsgruppe errechnet.

Um quantitative Unterschiede im Ca-Einbau der Knochen erkennen zu können, die Rückschlüsse auf eine Hemmung der Trisetumaktivität zulassen, wurde beim letzten Versuch eine Fluoreszenzmarkierung mit Chlortetracyclin durchgeführt.

4. Eigene Untersuchungen

4.1. Methodik

Die Aktivität des Goldhafers wurde in einem biologischen Test an Küken im Vergleich zu Vitamin D_3 und $1,25(OH)_2D_3$ untersucht. Dazu wurden insgesamt sechs Einzelversuche durchgeführt und ausgewertet.

Alle sechs Versuche wurden mit männlichen Küken durchgeführt, die als Eintagsküken aufgestellt und depletiert wurden. Während dieser Depletionsperiode wurden die Tiere mit Vitamin D_3 -freiem Futter versorgt. Danach wurden die Küken einzeln gewogen und in verschiedene Gewichtsklassen eingeteilt. Für die folgende Versuchsperiode wurden nur Küken mit mittleren Gewichten verwendet. Diese Tiere wurden nun so zusammengestellt, daß die Gesamtgewichte der einzelnen Versuchsgruppen in etwa gleich waren (siehe Tab.1). Nach Kennzeichnung der einzelnen Küken mit Flügelmarken wurde jede Gruppe unter Berücksichtigung der Licht- und Temperaturverhältnisse auf je zwei Käfige (Ausnahme Versuch VI) verteilt.

Für die Dauer der Versuchsperiode erhielt jede Versuchsgruppe eine bestimmte Futterration, die Vitamin D_3 , $1,25-(OH)_2D_3$ oder Goldhafer enthalten konnte. Um die Hemmbarkeit der biologischen Wirkung dieser Komponenten zu überprüfen, wurde während der ganzen Versuchsdauer gruppenweise Strontium oder EHDP (Äthan-1-Hydroxy-1,1-Diphosphonat) verabreicht.

Die unterschiedlichen Tierzahlen und Versuchslängen der Einzelversuche können der Tabelle 1 entnommen werden.

Tabelle 1

Versuchsaufbau der 6 Einzelversuche

Versuch	I	II	III	IV	V	VI
Versuchsküken	Lohmann Broiler	Lohmann Broiler	Leghorn	Lohmann Broiler	Lohmann Broiler	Lohmann Broiler
Depletionsperiode (Tage)	14	14	21	10	12	10
Versuchsperiode (Tage)	7	7	7	5	6	5
Anzahl der Küken in Depletionsperiode	102	200	237	200	300	400
Anzahl der Küken in Versuchsperiode	72	128	128	128	192	240
Anzahl der Versuchsgruppen	6	8	8	8	12	15
Anzahl der Küken pro Versuchsgruppe	12	16	16	16	16	16
$\bar{x}$ Gewicht einer Versuchsgruppe (g)	2500	3180	2060	2650	2950	2850

4.2. Tierhaltung

Für die Dauer der Depletions- und Versuchsperiode wurden die Küken in Gitterkäfigen gehalten, die eine Fläche von je $0,8 \text{ m}^2$ und eine Höhe von 36 cm aufwiesen. Der Boden bestand aus Maschendraht, durch den die Ausscheidungsprodukte auf herausnehmbare Kotbleche fallen konnten. Futter und frisches Wasser konnten ad libitum aufgenommen werden. Die 24 Einzelkäfige waren gleichmäßig auf die beiden Längsseiten des 10 m^2 großen Stalles verteilt, so daß je drei neben- und je vier übereinanderstanden.

Die Küken erhielten 24-Stunden-Dauerlicht, das von zwei senkrechten Lichtketten mit je sieben 60 Watt-Birnen ausgestrahlt wurde. Die Temperatur regulierte man durch elektrische Heizkörper. Für die Dauer der ersten Lebenswoche der Küken wurde sie konstant auf ca. 32° C gehalten. Mit jeder weiteren Woche senkte man die Temperatur um ca. 2° C ab. Frischluft wurde durch Zwangsbelüftung zugeführt.

4.3. Fütterung

Die Broiler bekamen während der Depletionsperiode alle ein einheitliches Vitamin D_3 -freies Alleinfutter (Tab. 2). Lediglich bei den Leghornküken (Versuch III) wurde die Zusammensetzung der einzelnen Komponenten verändert (Tab. 3).

Für die Dauer der Versuchsperioden wurden andere Basalrationen gewählt, die sich teilweise von Versuch zu Versuch unterscheiden und in Tabelle 4 dargestellt sind.

Tabelle 2

Vitamin D₃-freie Basalration für Lohmann Broiler

Rationszusammensetzung	%
Sojaextraktionsschrot (44 % Rohprotein)	60,00
Maisstärke	21,56
Sojaöl	15,00
Dicalciumphosphat ($\text{CaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	1,08
Calciumcarbonat (CaCO_3)	1,50
Kochsalz (NaCl)	0,40
DL-Methionin	0,26
Vitaminvormischung ^{a)}	<u>0,20</u>
	<u><u>100,00</u></u>

a) Vitaminvormischung enthält in 2 g (auf Soja und
Maisstärke)

Vitamin A	10 000 I.E.	Ca-Pantothenat	15 mg
Vitamin E	100 mg	Nikotinsäure	40 mg
Vitamin K ₃	1 mg	MnSO ₄ x H ₂ O	200 mg
Vitamin B ₂	4 mg	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	200 mg
Vitamin B ₆	2 mg	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	100 mg
Vitamin B ₁₂	20 mcg	Cholinchlorid	200 mg

Tabelle 3

Vitamin D₃-freie Basalration für Leghorn (Versuch III)

Rationszusammensetzung	%
Mais	62,00
Sojaextraktionsschrot (44 % Rohprotein)	34,16
Dicalciumphosphat ($\text{CaHPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	1,40
Calciumcarbonat (CaCO_3)	1,50
Kochsalz (NaCl)	0,40
DL-Methionin	0,20
Lysin (80 %ig)	0,14
Vitaminvormischung ^{a)}	<u>0,20</u>
	<u><u>100,00</u></u>

a) siehe Tab. 2

Tabelle 4

Unterschiedliche Basalrationen während der Versuchsperioden

Versuch	I	II	III	IV-VI
Rationszusammensetzung (%)				
Sojafeinmehl	45,00			
Sojaextraktionschrot (44 % Rohprotein)		52,000	33,000	52,000
Maismehl			60,485	
Maisstärke	21,55	31,795		33,595
Sojaöl	13,00	10,000		9,000
Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	1,20	1,000	1,200	1,000
Calciumcarbonat (CaCO_3)				0,680
DL-Methionin	0,25	0,230	0,200	0,250
Lysin (80 %ig)			0,140	
Vitaminvormischung a)	0,20	0,200	0,200	0,200
Diätvariablen b)	18,80	4,775	4,775	3,275
	100,00	100,000	100,000	100,000

a) siehe Tabelle 2

b) Die unterschiedlichen Diätvariablen sind bei den einzelnen Versuchsdurchführungen (siehe 5.1. bis 5.6.) näher beschrieben.

4.4. Herkunft und Verwendung der unterschiedlichen Diätvariablen

Das Futter der einzelnen Versuchsgruppen innerhalb eines Versuches unterschied sich in der Zusammensetzung der Diätvariablen (siehe 5.1. bis 5.6.). Diese Futterzusätze enthielten entweder Goldhafer oder Vitamin D_3 , $1,25(OH)_2D_3$ oder keinen dieser Wirkstoffe, deren Hemmbarkeit mit Strontium oder EHDP überprüft wurde.

Der in allen Versuchen verwendete Goldhafer entstammte einer Monokultur, die auf dem Lehr- und Versuchsgut Schleißheim der Universität München aufwuchs und im August 1977 geerntet wurde. Sofort nach dem Schnitt wurde dieser in Plastiksäcke abgefüllt und eingefroren. Vor seiner Verwendung wurde Goldhafer lyophilisiert und anschließend gemahlen. Während er in dieser Form im Versuch I eingesetzt wurde, verfütterte man ihn bei allen übrigen Versuchen als Ätherextrakt, dessen Aktivität durch ZUCKER et al. (1977) nachgewiesen wurde. Für die Extraktion wurden je 200 g Triacetum mit 1 l Diäthyläther angesetzt und nach 24 Stunden über eine Nutschflasche mit Weißbandfilter abfiltriert, bis sich unter ständigem Ätherzusatz das grünlige Filtrat entfärbte. Durch Erwärmen im Rotationsverdampfer wurde der Extrakt eingeeengt und anschließend in die Futterration eingemischt.

Das von der Fa. Hoffmann-La Roche, Basel, freundlicherweise zur Verfügung gestellte $1,25(OH)_2D_3$ wurde im Versuch I und II mit dem Futter verabreicht. In allen anderen Versuchen wurde es in Äthanol gelöst und den Kühen täglich einmal per Schlundsonde instilliert.

Das Vitamin D_3 der gleichen Firma wurde in allen Versuchen den verschiedenen Futterrationen beigelegt.

Calcium oder Strontium wurden jeweils als Carbonat verfüttert. Dabei wurde bei den mit Strontium gehemmten Kü-

ken auf einen äquimolaren Ersatz des Ca durch Sr geachtet.

4.5. Neue Blutnahmetechnik bei Küken

Für die Bestimmung der Serumproben wurden Blutproben der Versuchsküken benötigt. Die herkömmlichen Methoden der Blutentnahme bereiteten bei den jungen Tieren jedoch Schwierigkeiten. Die Blutnahme aus der Flügelvene lieferte nur ungenügende Mengen und mit der Herzpunktion konnten auch nur unsichere Erfolge verzeichnet werden. Aus diesen Gründen mußte eine neue Blutnahmetechnik für die zweiwöchigen Küken entwickelt werden, die diese Nachteile nicht besaß.

Bei dieser neuen Technik wurden die Ständer der Küken nach Versuchsende mit selbstsichernden Plastikverschlüssen zusammengebunden. Anschließend wurden die Tiere in runde 1000 ml Plastikflaschen gesteckt, deren Boden entfernt und deren Hals soweit abgetragen wurde, daß Kopf und Hals der Küken bequem hindurchpaßten. Diese Flaschen waren einzeln mit etwas nach unten geneigtem Flaschenhals an je einem Stativ befestigt. Auf diese Weise waren die Küken gut fixiert.

Die rechte Halsseite der Tiere wurde im Bereich der durchscheinenden Vena jugularis von Flaum und Federn befreit. Anschließend schnitt man diese Vene mit einem Skalpell auf und fing ca. 6 bis 8 ml Blut mit einem Röhrchen auf. Diese 10 ml Röhrchen aus Polypropylen (Fa. W. Sarstedt, Bestell-Nr. 95/16 LK) waren mit gerinnungsförderndem Granulat bestückt. Sobald die Blutproben geronnen waren, löste man sie vorsichtig mit einem Glasstab vom Rande der Röhrchen ab. Anschließend wurden sie für 10 Minuten bei 3000 U./min zentrifugiert und das Serum mit Pasteurpipetten abgezogen.

Sollten die Tiere nach der Blutnahme nicht getötet werden, wurde für den Halsschnitt die linksseitige Jugularvene bevorzugt. Da diese wesentlich schwächer als die rechte ist (NICKEL et al., 1973), konnte auch die Blutung mit Tupferkompressen leichter gestillt werden. Außerdem störte beim Schneiden die Speiseröhre nicht. Auf diese Weise war es möglich, nach einigen Tagen auf der gleichen Halsseite abermals Blut zu gewinnen. Brachte man anschließend mit einer Ligatur aus dünnem Katgut diese Blutung zum Stillstand, konnten wiederum nach wenigen Tagen an der linken Halsseite Blutproben gesammelt werden. Durch diese neue Blutnahmetechnik ist es möglich, schon bei zweiwöchigen Broilern, einfach und schnell, genügend Blut zu gewinnen.

4.6. Bestimmungsmethoden der untersuchten Parameter

4.6.1. Bestimmung des anorganischen Phosphors im Serum

Phosphat bildet in salpetersaurer Lösung mit Molybdat und Vanadat einen Farbkomplex, dessen Intensität von der Phosphatkonzentration abhängt.

Dieses Prinzip wurde zur Bestimmung des anorganischen Phosphors im Serum benutzt und dabei nach der Arbeitsanleitung der "Test-Combination Phosphor, Phospholipide" der Fa. Boehringer, Mannheim, vorgegangen (Bestell-Nr. 124974).

Zentrifugengläser mit 0,1 ml Küken Serum wurden zur Ent-eiweißung mit 2 ml 0,6 n Trichloressigsäure versetzt. Nach 10 min wurden die Proben bei 3500 U/min zentrifugiert (10 min) und aus dem klaren Überstand 1 ml in ein Reagenzglas abpipettiert. Dazu wurden nun je 1 ml

Ammoniummolybdat und Ammoniumvanadat gegeben, deren Konzentrationen in der erwähnten Test-Combination aufgeführt sind. Um evtl. Trübungen zu beseitigen, wurde nach 10 min kurz nachzentrifugiert und anschließend die Extinktion gemessen. Von allen Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die einzelnen Lösungen wurden in Küvetten verbraucht und die Bestimmungen der Extinktionen bei 366 nm Wellenlänge am Photometer PM Q II der Fa. Carl Zeiss durchgeführt.

In jeder Meßreihe wurde ein Standard (0,5 mg P/100 ml) mitgeführt und aus dem Vergleich der Extinktionen (E) der anorgan. Phosphorgehalt der Proben errechnet:

$$\frac{E_{\text{Probe}}}{E_{\text{Standard}}} \times 10,5 = \text{mg anorgan. P/100 ml Serum}$$

4.6.2. Bestimmung des Calciums und Strontiums im Serum

Auch hier wurden wieder, soweit möglich, Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Serumproben für die Ca-Bestimmung verdünnte man mit der Verdünnungslösung nach Hermann (Merck 9975) im Verhältnis 1:20. Die Verdünnungslösung enthält ein Netzmittel und gleicht die physikalischen Eigenschaften (z. B. Viskosität) des Serums und der Eichlösung einander an. Die Messung der Ca-Konzentration erfolgte mittels Atomabsorptionsspektralphotometrie (AAS) mit dem Gerät M4 QIII/FA2 der Fa. Carl Zeiss unter folgenden apparativen Bedingungen:

Wellenlänge	422,7 nm
Brenngas	Acetylen
Spaltbreite	0,01 mm
Hohlkathodenstrom	10 mA

Die Vergleichslösung (Merck 9976) enthielt unter anderem 10 mg Ca/100 ml und wurde ebenso wie das Serum mit Verdünnungslösung im Verhältnis 1:20 verdünnt (Meßbereich 5 ppm Ca). Zur Qualitätskontrolle diente ein Kontrollserum (Precinorm S, Boehringer, Charge Nr. 612) mit dem Sollwert von 10,22 mg Ca/100 ml, das in jeder Meßreihe ab Versuch III mitgeführt wurde.

Die Strontiumbestimmung erfolgte ähnlich wie die Ca-Bestimmung. Vor der AAS-Messung wurden die Serumproben unter Zusatz von 1 % Lanthan zur Ausschaltung von Querstörungen (Lanthan als La_2O_3) im Verhältnis 1:10 mit aqua dest. verdünnt. Zum Vergleich dienten Eichlösungen mit Sr-Gehalten zwischen 5 und 20 ppm (Strontium als $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$), die ebenfalls 1 % Lanthan enthielten. Die Bestimmung wurde mit der entsprechenden Hohlkathodenlampe und bei folgenden Bedingungen am AAS durchgeführt:

Wellenlänge	460,73 nm
Brenngas	Acetylen
Spaltbreite	0,035 mm
Hohlkathodenstrom	10 mA

Die Serumgehalte an anorgan. Phosphor, Calcium und Strontium werden in den Ergebnistabellen in mg/100 ml angegeben.

Die Faktoren zur Umrechnung in SI-Einheiten können der Tabelle 5 entnommen werden.

Tabelle 5

Umrechnungsfaktoren für SI-Einheiten

Parameter	angegebene Einheit	Faktor	SI-Einheit
P	(mg/100 ml) x 0,3229	=	(mmol/l)
Ca	(mg/100 ml) x 0,2495	=	(mmol/l)
Sr	(mg/100 ml) x 0,1141	=	(mmol/l)

4.6.3. Bestimmung des CaBP in der Dünndarmmukosa

Die Messungen des Calcium-bindenden Proteins (CaBP), die ein anderer Doktorand des Instituts (NITSCHKE H., 1978) bei meinen Versuchsküken vornahm, darf ich freundlicherweise zur Abrundung meiner Ergebnisse kurz darstellen.

Bei der angewandten Methode wurde das Gesamtprotein der Dünndarmmukosa nach LOWRY et al. (1951) und das Calcium-bindende Protein nach einer Ionenaustauschmethode (WASSERMAN et al., 1968) bestimmt. Da zwischen der CaBP-Konzentration und deren Bindungsaktivität eine lineare Beziehung besteht (WASSERMAN et al., 1968), ist dies eine Möglichkeit, die Menge des CaBP zu berechnen. Das Calcium-bindende Protein wurde dabei in Prozent der Radioaktivität im Überstand, bezogen auf die Gesamtaktivität, pro mg Gesamtprotein angegeben.

4.6.4. Bestimmung des Asche- und Calciumgehaltes der Tibia

Nach dem Töten der Küken durch Dislokation der Halswirbelsäule wurde jeweils der linke Unterschenkel oberhalb des Kniegelenkes abgeschnitten und bis zur weiteren Behandlung bei ca. -20°C eingefroren.

Nach Erhitzen mit kochendem Wasser (30 min) konnten die Tibien vom umgebenden Weichgewebe befreit werden. Anschließend wurden noch das Periost und die Epiphysen entfernt, so daß nur noch die Meta- und Diaphysen der Tibien einheitlich zur Untersuchung vorlagen. Diese Knochen kamen für 24 Stunden bei 105°C in den Trockenschrank und wurden danach einzeln in Porzellantiegeln auf der Analysenwaage eingewogen (Trockengewicht). Das genaue Leergewicht der Tiegel war bekannt. Nach dem Veraschen im Muffelofen (550°C und 24 Stunden) und dem Abkühlen im Exsikkator stellte man die Gewichte der Tibiasaschen fest, welche in % des Trockengewichtes umgerechnet wurden.

Die Asche der einzelnen Knochen wurde quantitativ in je ein 100 ml Becherglas überführt und mit 5 ml rauchender Salzsäure auf einem Sandbad fast bis zur Trockene eingedampft. Unter Zugabe von 10 ml HCl 1:1 erhitzte man weiter und filtrierte diese heiße Aufschwemmung durch ein Weißbandfilter in 100 ml Meßkolben. Nach zweimaligem Nachwaschen der Bechergläser mit heißem aqua dest. wurden die Kolben ad 100 ml mit aqua dest. aufgefüllt und von diesen Lösungen Verdünnungen von 1:100 oder 1:200 hergestellt, die 1 % Lanthan enthielten. Von diesen Proben führte man Doppelbestimmungen am AAS unter den apparativen Bedingungen durch, wie sie für die Ca-Bestimmung im Serum angegeben wurden (4.6.2.). Zum Vergleich dienten Eichlösungen mit Ca-Gehalten von 5 oder 10 ppm, die ebenfalls 1 % Lanthan zum Ausschalten der Querstörungen enthielten.

Nach der Berechnung

Mittelwert	Probe	X Verdünnungsfaktor	X mg Ca/100 ml
Mittelwert	Eichlösung		Eichlösung

wurde der Ca-Gehalt der Tibia in % der Knochenasche angegeben.

4.6.5. Bestimmung der Chlortetracyclinmarkierung der Tibia

Mit Hilfe der Fluoreszenzmarkierung durch Chlortetracyclin sollte die durch Stontium oder EHDP bedingte Hemmbarkeit der Knochenmineralisation nachgewiesen werden. Um diesen Nebeneffekt des Antibiotikums besser verstehen zu können, werden die experimentellen Ergebnisse dieser Markierungsmethode im folgenden Abschnitt dargestellt.

Nach oralen oder parenteralen Tetracyclingaben tritt im menschlichen oder tierischen Gewebe (Ausnahme Nervensystem) eine Fluoreszenz auf, die bei UV-Licht von 365 nm sichtbar wird (MILCH et al., 1958). Da sie durch eine goldene Färbung gekennzeichnet ist, unterscheidet sie sich deutlich von der bläulichen Eigenfluoreszenz des Knorpels. Schon ab Dosen von 0,25 mg/kg Körpergewicht ist sie bei Ratten nachweisbar und verschwindet nach 12 bis 24 Stunden in allen Weichgeweben, während sie in Knochen und Zähnen beständig ist. Hier tritt die Fluoreszenz nur in neugebildetem Knochengewebe der Meta- und Diaphyse auf, während der Epiphysenfugenknorpel nicht fluoresziert.

Die leuchtende Zone, die zwischen fertig mineralisier-

tem Knochengewebe und dem neugebildeten Osteoid liegt, wird auch als Demarkationszone bezeichnet (FROST H. M., 1962).

Bei in vitro Versuchen gelang der Nachweis, daß Tetracyclin von Hydroxyapatitkristallen gebunden wird und fluoresziert (SKINNER and NALBANDIAN, 1975). Durch die Struktur des Tetracyclinmoleküls ist es möglich, im Apatitkristall drei Calciumionen zu überlagern und zwei Phosphationen zu ersetzen, ohne die elektrische Neutralität des Komplexes zu verändern. Da der Hydroxyapatit mineralisiertes Gewebe charakterisiert, wird die stabile in vivo Markierung des Knochengewebes durch Tetracycline mit diesem Modell erklärt.

Andere Autoren vermuten, daß Tetracyclin bereits mit dem freien Calcium des Blutes einen Komplex bildet und dann erst mit den Gewebestrukturen reagiert (WINCKLER und WESTPAHL, 1973).

Durch Tetracyclinmarkierungen ist es also möglich, einen Einblick in den Skelettstoffwechsel zu erhalten. Denn, wie bereits ausgeführt, zeigen weder das bereits mineralisierte Knochengewebe noch der neugebildete osteoide Saum die gelbliche Fluoreszenz. Außerdem korrespondiert die Dauer der Tetracyclingabe mit der fluoreszierenden Breite im Gewebe (FROST H. M., 1962). Durch wiederholte Injektion der Markierungssubstanz in bestimmten zeitlichen Abständen ist es möglich, die Kinetik des Knochenwachstums zu bestimmen (VANDERHOEFT et al., 1962). Hierzu werden die fluoreszierenden Ringe der Havers'schen Lamellen (sogenanntes Osteon) am Knochenquerschnitt mikroskopisch beurteilt.

Es konnte sogar eine lineare Abhängigkeit der Tetracyclindosis zum Logarithmus der markierten Osteone festgestellt werden (HATTNER et al., 1977).

Diese Markierungsmethode ist geeignet, neben der Osteo-

genese (KRUT'KO and BLINKOV, 1974) auch den Einfluß bestimmter Hormone (z. B. Wachstumshormon, Prolactin, Parathormon) auf die Knochenkinetik zu beschreiben (THORNGREN and HANSSON, 1974; DEEB and HERRMANN, 1974).

Es gelang sogar, die Wirkung von EHDP (siehe 2.4.) auf die Knochenmineralisation bei Ratten darzustellen (SCHENK et al., 1973).

Nach dieser Darstellung der Möglichkeiten, die sich mit der Tetracyclinmarkierung bieten, wird nun die Bestimmungsmethode der Fluoreszenzmarkierung beschrieben, die im Versuch VI angewandt wurde.

In diesem Versuch wurde dem Kükenfutter für 2 Tage Chlor-tetracyclin zugesetzt. Um die Einlagerung dieses Antibiotikums durch Fluoreszenz nachweisen zu können, wurde bei den getöteten Küken die rechte Tibia untersucht. Von diesem Knochen wurden Weichteile und Epiphysen entfernt, wie es unter 4.6.4. beschrieben ist. Für eine semiquantitative Bestimmung wurden jeweils zwei repräsentative Schnitte angelegt, die eine vergleichende makroskopische Beurteilung nach verschiedenen Kriterien zuließen. Nach einem Querschnitt in die Diaphysenmitte ließ ein halbierender Längsschnitt durch die proximale Dia- und Metaphyse eine mediale und laterale Knochenhälfte entstehen. Anschließend wurde die Fluoreszenz der Nativpräparate eingehend bei UV-Licht von 366 nm Wellenlänge betrachtet. An den einzelnen Querschnitten verglich man die Intensität und die Breite des fluoreszierenden Knochengewebes, welches gleichsam einen leuchtenden Ring um die Knochenmarkshöhle bildete. An den Längsschnitten wurde die Leuchtkraft der Spongiosa beurteilt. Außerdem bestimmte man hier die Längen der fluoreszierenden und der Gesamtspongiosa samt Knorpelkappe mittels einer Schublehre in mm. Um diese Fluoreszenzmarkierungen möglichst objektiv differenzieren zu können, wurde nach

einem Schema die Fluoreszenz der einzelnen Tibiaknochen ohne vorherige Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit von "sehr schwach" bis "sehr stark" beurteilt und dafür Zahlen von 1 bis 5 vergeben:

1	sehr schwach
2	schwach
3	mittel
4	stark
5	sehr stark

Nach Errechnung der Mittelwerte wurden diese Zahlen in der Ergebnistabelle wieder durch die zugeordnete Bezeichnung ersetzt.

4.7. Statistik

Die Versuchsergebnisse wurden als Mittelwerte ($\bar{x}$) wiedergegeben und, soweit dies sinnvoll und möglich war, mit den zugehörigen Standardabweichungen ($\pm s$) versehen.

Die statistische Auswertung der wichtigsten Ergebnisse wurde mit Hilfe der zwei- oder dreistufigen Varianzanalyse und mit der Beurteilung nach Scheffé durchgeführt (SACHS L., 1972). Lag bei den Einzelwerten keine Normalverteilung vor, mußte auf den parameterfreien H- und U-Test zurückgegriffen werden.

Den zum Teil notwendigen Vergleich zweier relativer Häufigkeiten ermittelte man mit dem Vierfelder-Chi-quadrat-Test, der ebenfalls von SACHS (1972) beschrieben wurde.

5. Versuchsanordnung und Ergebnisse

Die Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Anordnung der einzelnen Versuche sind der Tabelle 1 auf Seite 18 zu entnehmen.

Die Futterrationen für die Depletions- oder Versuchsperiode sind in den Tabellen 2 bis 4 aufgeführt. Die von Versuch zu Versuch unterschiedlichen Diätvariablen werden bei den entsprechenden Versuchsdurchführungen erklärt. Da diese Diätvarianten innerhalb eines Versuches prozentual verschieden groß waren, mußten fehlende Gewichts-% mit Maisstärke ausgeglichen werden.

5.1. Versuch I

Im Versuch I wurde die antirachitische Wirkung von Goldhafer im Vergleich zu Vitamin D_3 untersucht. Da Strontium die biologische Aktivität von Vitamin D_3 , nicht aber die von $1,25(OH)_2D_3$ hemmt, sollte durch Strontiumfütterung auch die Hemmbarkeit der Trisetumaktivität überprüft werden.

5.1.1. Versuchsdurchführung

In der Tabelle 6 werden die Diätunterschiede der 6 Versuchsgruppen aufgezeigt. Die angegebenen Einheiten an Vitamin D_3 oder $1,25(OH)_2D_3$ wurden in je 1 kg des entsprechenden Versuchsfutters eingemischt.

Wurde den Küken kein lyophilisierter und gemahlener Goldhafer gefüttert, setzte man Grünflocken ein, das frei von *T. flavescens* war und zusätzlich noch für 24 Stunden

auf 105° C erhitzt wurde.

Tabelle 6

Diätvariablen im Versuch I

Gruppe	1	2	3	4	5	6
Ca (%)	1,0	-	1,0	-	1,0	-
Sr (%)	-	2,2	-	2,2	-	2,2
Vit. D ₃ (I.E./kg)	600	600	-	-	-	-
1,25 D ₃ (mcg/kg)	-	-	-	10	-	-
Gold- hafer (%)	-	-	-	-	15	15
Grün- mehl (%)	15	15	15	15	-	-

5.1.2. Ergebnisse

Nach einer Woche Vitamin D-freier Fütterung (Depletionsperiode) saßen die Küken vermehrt auf den nach vorne ausgestreckten Ständern. Einige zeigten schon einen unsicheren Gang, der nach 10 Tagen bei allen Broilern ausgeprägt war. Sie konnten sich häufig nur noch mit Flügelunterstützung erheben. Trotz vermehrtem Liegen, z. T. in halbseitlicher Lage, war die Wasser- und Futteraufnahme auch am 14. Tage nicht eingeschränkt.

Nach 4 Versuchstagen zeigten die Küken in den einzelnen Gruppen ein unterschiedliches Verhalten, das bis zum 7. Tage immer ausgeprägter wurde.

Die Tiere der Gruppe 1, die zur Basalration Calcium und Vitamin D_3 erhielten, machten einen gesunden Eindruck und konnten aufrecht stehen.

Die Broiler der Gruppe 2 (Sr; Vit. D_3) und 3 (Sr) standen unsicher mit gebeugten Tarsalgelenken und taumelten teilweise beim Laufen.

Die Küken in Gruppe 4 (Sr; 1,25 D_3) zeigten überraschenderweise ebenfalls einen tappenden und unsicheren Gang.

Die Broiler der Gruppe 5 (Ca; Goldhafer) bewegten sich so lebhaft wie die der Gruppe 1.

Die Küken in Gruppe 6 (Sr; Goldhafer) standen so unsicher und gebeugt wie die Tiere der übrigen Sr-Gruppen.

In Tabelle 7 werden die Versuchsergebnisse nach 7 oder 14 Versuchstagen dargestellt.

Die Küken der Gruppe 1 (Ca; Vit. D_3) und 5 (Ca; Goldhafer) zeigen nach 7 Versuchstagen einen normalen Verzehr und gute Gewichtszunahmen. Diese Werte erhöhen sich erwartungsgemäß nach einer weiteren Versuchswoche und werden von keiner anderen Kükengruppe erreicht, in der Calcium durch Strontium ersetzt wurde. Die Ergebnisse der Gruppe 2 (Sr; Vit. D_3) und 3 (Sr) sind nach 7 Versuchstagen einander sehr ähnlich. Doch nach einer weiteren Versuchswoche nehmen die Broiler der Gruppe 2 besser zu als die der Gruppe 3. Dies dürfte auf den stark angestiegenen Futterverzehr zurückzuführen sein.

Bei den Küken der Gruppe 4 (Sr; 1,25 D_3) ist bei geringem Futterverzehr eine Gewichtsabnahme zu verzeichnen, die nach der zweiten Woche noch deutlicher wird.

Tabelle 7

Ergebnisse aus Versuch I

Gruppe	1		2		3		4		5		6	
Gruppen- symbol	Ca Vit. D ₃	7	14	Sr Vit. D ₃	7	14	Sr 1,25 D ₃	7	14	Ca Goldh.	Sr Goldh.	6
Versuchstage		7	14		7	14		7	14			
$\bar{x}$ Futterverz. (g/Tier u. Tag)		21	36		17	30		13	13			
$\bar{x}$ Gew.-Zun. (%)		29	98		8	40		-7	-22			
Mortalität (%)		8			17			17				
n ₁		11	7		10	5		10	2			
$\bar{x}$ Tibia-Asche (% d. Tr.-Subst.)		42	45		34	26		33	31			
$\bar{x}$ Tibia-Ca (% d. Asche)		31	31		24	22		21	21			
n ₂		4	7		5	5		7	3			
$\bar{x}$ Serum P		4,4			7,6			7,3				
$\pm s$ (mg/100 ml)		$\pm 1,6$			$\pm 1,2$			$\pm 0,9$				
$\bar{x}$ Serum Ca		10,9			7,1			5,6				
$\pm s$ (mg/100 ml)		$\pm 1,5$			$\pm 1,0$			$\pm 1,0$				
n ₃		10			9			9				

Die Broiler in Gruppe 6 (Sr; Goldhafer) nehmen in der ersten Versuchswoche nicht zu. Doch nach weiteren 7 Tagen erreichen sie die gleichen Zunahmen wie die Tiere der Gruppe 2 (Sr; Vit. D₃), obwohl der durchschnittliche Verzehr kaum anstieg. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß in der ersten Versuchswoche in Gruppe 6 Küken mit hohen Gewichtsverlusten berücksichtigt werden, die in der zweiten Woche nicht mehr vorhanden sind. An der Mortalität der Küken in den einzelnen Gruppen ist nichts Auffälliges zu bemerken. Denn von den drei in Gruppe 6 gestorbenen Broilern verendeten zwei bereits am ersten Versuchstag. Damit ist deren Todesursache sicherlich nicht auf das Versuchsfutter zurückzuführen.

Der besseren Übersicht wegen werden die Asche- und Calciumgehalte der Tibien gerundet dargestellt. Die n_2 -Zahlen der Gruppe 4 und 6 nach 14 Versuchstagen unterscheiden sich von den entsprechenden n_1 -Zahlen, da hier noch die Knochen von zwei Küken berücksichtigt wurden, die nach dem 12. Versuchstag starben. Beim Betrachten der Werte fällt auf, daß die Küken der Gruppe 1 (Ca; Vit. D₃) und 5 (Ca; Goldhafer) deutlich höhere Asche- und Calciumgehalte in den untersuchten Knochen aufweisen als die der übrigen Gruppen, in denen Ca durch Sr ersetzt wurde. Außerdem kann nach 7 weiteren Versuchstagen mit Vit. D₃ (Gruppe 1) oder Goldhafer (Gruppe 5) in der Diät eine signifikante Steigerung ($\alpha < 0,05$ bzw. $\alpha < 0,10$) des Aschegehaltes erreicht werden. Während sich in Gruppe 1 der relative Calciumgehalt der Tibia bei längerer Versuchsdauer nicht ändert, kann eine signifikante Zunahme ($\alpha < 0,05$) des relativen Calciumwertes in Gruppe 5 festgestellt werden.

Bei den Küken der Gruppe 2 (Sr; Vit. D₃) und 3 (Sr)

sieht man nach der zweiten Versuchswoche einen deutlichen Abfall des Aschegehaltes in den Tibien ($\alpha < 0,05$ bzw. $\alpha < 0,10$). Ist $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Gruppe 4) oder Goldhafer (Gruppe 6) in der Ration, wird dieses Abnehmen nicht signifikant. Vergleicht man dagegen die Calciumgehalte aller vier Strontiumgruppen, so kann weder nach 7 noch nach 14 Versuchstagen ein deutlicher Unterschied festgestellt werden.

Die Tabelle 7 informiert außerdem über die Serumwerte nach der ersten Versuchswoche. Konnte wegen Serum-mangel die Calciumbestimmung nicht durchgeführt werden, so wurde auch der entsprechende Phosphorwert in der Tabelle nicht berücksichtigt. Deshalb unterscheiden sich auch die angegebenen n_3 -Zahlen von den n_1 -Zahlen. Beim Betrachten der Serumwerte fällt auf, daß in Gruppe 1 (Ca; Vit. D_3) und 5 (Ca; Goldhafer) die Phosphorwerte deutlich niedriger sind als in den anderen Gruppen, in denen Calcium durch Strontium ersetzt wurde. Dabei ist die Phosphorkonzentration der Gruppe 5 noch signifikant größer ($\alpha < 0,10$) als diejenige der Gruppe 1. Umgekehrt verhält es sich mit den Calciumwerten. Hier liegen die Ergebnisse der beiden Ca-Gruppen deutlich über denen der Sr-Gruppen, wobei nun der durchschnittliche Ca-Wert in Gruppe 1 wesentlich größer ist als in Gruppe 5.

Den vier Sr-Gruppen (Gruppe 2, 3, 4 und 6) ist ein hoher Phosphorwert gemeinsam (7,3 - 7,6 mg/100 ml), der keine signifikanten Unterschiede erkennen läßt. Die im Vergleich zu Gruppe 1 und 5 niedrigen Calciumwerte unterscheiden sich in den Strontiumgruppen voneinander. Hier fällt auf, daß der Ca-Spiegel in Gruppe 4 (Sr; $1,25 \text{ D}_3$) wesentlich niedriger liegt als in Gruppe 2 (Sr; Vit. D_3).

Faßt man die Ergebnisse zusammen, so ist deutlich zu erkennen, daß *Trisetum flavescens* wie Vitamin D_3 antirachitisch wirkt, wenn Calcium in der Futterration enthalten ist. Dies wird an den hohen Calcium- und niederen Phosphorwerten des Serums ersichtlich, die als physiologisch anzusehen sind. Sowohl die Beobachtung der lebenden Küken als auch die Daten der Tabelle 7 lassen diesen Schluß zu. Dabei scheinen 15 % Goldhafer nicht so aktiv zu sein wie 600 I.E. Vitamin D_3 /kg, wenn die Serum- und Knochenwerte der Gruppe 1 und 5 miteinander verglichen werden.

Wird in der Diät Ca durch Sr ersetzt, werden die Küken rachitisch; dies ist am niederen Calcium- und hohen Phosphorspiegel des Serums und am geringen Aschegehalt der Knochen deutlich erkennbar. Warum auch die Gruppe 4 mit Sr und $1,25(OH)_2D_3$ in der Versuchsration rachitische Erscheinungen aufweist, ist nicht erklärbar. Denn hier hätte man physiologische Daten erwartet, da bekanntlich die Aktivität von $1,25(OH)_2D_3$ (im Gegensatz zu Vit. D_3) durch Strontium nicht gehemmt wird. Eine vermutete Unwirksamkeit des aktiven Metaboliten kann ausgeschlossen werden, denn dann müßten die Broiler in Gruppe 4 ähnliche Zunahmen erreichen wie die in Gruppe 3 (Sr) und dürften keine Gewichtsabnahmen aufweisen. Diese Gewichtsverluste könnten mit einer erhöhten Toxizität des Strontiums in Gegenwart von $1,25-(OH)_2D_3$ zusammenhängen, deren Ursache auf einer vermehrten Strontiumresorption beruhen würde. Die niedrigen Ca-Werte der Kükentibien der gleichen Gruppe (Sr; $1,25-D_3$), die mit einer vermehrten Strontiumeinlagerung bei gleichzeitigem Calciumabbau zu erklären sind, unterstützen diese Vermutung.

Da die Broiler der Gruppe 4 (Sr; $1,25 D_3$) rachitische Erscheinungen zeigten, kann nicht entschieden werden,

ob T. flavescens ähnlich dem Vitamin D_3 oder dem $1,25-(OH)_2D_3$ wirkt. Um hier einen besseren Einblick zu erhalten, wurden im nächsten Versuch einige Änderungen vorgenommen.

5.2. Versuch II

5.2.1. Versuchsdurchführung

Um diesmal bessere Ergebnisse als im Versuch I erzielen zu können, wurde, wie aus Tabelle 8 ersichtlich ist, der Versuch II mit mehr Versuchsgruppen und doppelten Mengen an Vitamin D_3 , $1,25(OH)_2D_3$ und Goldhafer durchgeführt. Da 30 % Goldhafer für das Einmischen zu voluminös waren, wurde ein Ätherextrakt aus der entsprechenden Trisetummenge verwendet. (siehe 4.4.).

Tabelle 8

Diätvariablen im Versuch II

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8
Ca (%)	1,0	-	1,0	-	1,0	-	1,0	-
Sr (%)	-	2,2	-	2,2	-	2,2	-	2,2
Vit. D_3 (I.E./kg)	-	-	1200	1200	-	-	-	-
$1,25 D_3$ (mcg/kg)	-	-	-	-	20	20	-	-
Goldhafer- extr. (%)	-	-	-	-	-	-	30	30

5.2.2. Ergebnisse

Die Küken zeigten nach der Vitamin D-freien Depletionsperiode die gleichen Symptome, die bereits im Versuch I geschildert wurden und auf die Vitamin D-freie Haltung zurückzuführen sind.

Nach den anschließenden 7 Versuchstagen war bei den Küken ein gruppenweise unterschiedliches Verhalten zu erkennen.

Die Broiler in Gruppe 1 (Ca) standen unsicher und etwas wackelig.

Die Tiere der Gruppe 3 (Ca; Vit. D_3), 5 (Ca; 1,25 D_3) und 7 (Ca; Goldhafer) konnten gut und sicher stehen. In Gruppe 2 (Sr) zeigten die Küken neben vielem Liegen einen unsicheren Gang.

Auch in Gruppe 4 (Sr; Vit. D_3) waren diese Symptome vertreten, wobei die Broiler noch zusätzlich aggressiv und futterneidisch waren.

Die Küken der Gruppe 6 (Sr; 1,25 D_3) bewegten sich ebenfalls nur unsicher und tappend mit gebeugten Tarsalgelenken fort. Außerdem fielen hier etliche Broiler auf, die mit gesenktem Kopf müde herumsaßen und plötzlich damit begannen, sich unter Flügelschlagen nach rückwärts fortzubewegen.

Das Verhalten der Broiler in Gruppe 8 (Sr; Goldhafer) ist in etwa mit dem in Gruppe 4 vergleichbar.

Die Tabelle 9 zeigt Ergebnisse aus Versuch II. Dabei geht wie im Versuch I ein normaler Futterverzehr mit guten Gewichtszunahmen einher. Die Küken der Gruppe 3 (Ca; Vit. D_3), 5 (Ca; 1,25 D_3) und 7 (Ca; Goldhafer) zeigen bei einem Verbrauch von 22 bis 25 g/Tier und Tag Zunahmen, die zwischen 24 und 37 % liegen.

Die Broiler der Gruppe 1 (Ca) können kaum Gewichtszunahmen verzeichnen.

Tabelle 9

Ergebnisse aus Versuch II

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8
Gruppen- symbol	Ca	Sr	Ca	Sr	Ca	Sr	Ca	Sr
	-	-	Vit. D ₃	Vit. D ₃	1,25 D ₃	1,25 D ₃	Goldh.	Goldh.
$\bar{x}$ Futterverz. (g/Tier u. Tag)	20	15	22	12	25	13	25	15
$\bar{x}$ Gew.-Zun. (%)	1	-7	24	-13	37	-22	33	-6
Mortalität (%)	50	6	19	31	6	69	19	44
n_1	8	15	13	11	15	5	13	9
$\bar{x}$ Serum P $\pm s$ (mg/100 ml)	4,4 $\pm 1,2$	6,5 $\pm 1,5$	6,5 $\pm 1,1$	6,5 $\pm 1,1$	5,5 $\pm 1,3$	6,2 $\pm 1,2$	4,2 $\pm 0,7$	6,6 $\pm 0,9$
$\bar{x}$ Serum Ca $\pm s$ (mg/100 ml)	9,1 $\pm 1,5$	6,5 $\pm 1,4$	9,6 $\pm 0,7$	5,7 $\pm 0,7$	11,8 $\pm 1,0$	5,9 $\pm 1,1$	11,5 $\pm 0,8$	6,3 $\pm 0,9$
n_2	7	15	13	11	14	5	13	7

Bei den anderen vier Gruppen, in denen Ca durch Sr ersetzt wurde, sind der geringe Futterverzehr und die Gewichtsabnahmen bemerkenswert. Hier fällt auf, daß sich, im Vergleich zu Gruppe 2 (Sr), durch Vit. D_3 in der Ration die Gewichtsabnahme verdoppelt und durch $1,25(OH)_2D_3$ verdreifacht. Auch in der Gruppe 8 (Sr; Goldhafer) ist eine deutliche Gewichtsabnahme zu verzeichnen.

In den vier Sr-Gruppen starben von 64 Küken 24, während in den Ca-Gruppen "nur" 15 verendeten. Um Hinweise auf die Todesursache zu finden, wurden die einzelnen Gruppen statistisch ausgewertet. Dabei zeigte sich, daß die Mortalität der Sr-Gruppen signifikant höher ist als die der Ca-Gruppen ($\alpha < 0,05$). Außerdem verursacht die Kombination von Strontium und $1,25(OH)_2D_3$ in der Diät die größte Sterblichkeit. Sie liegt signifikant höher als in den Sr-Gruppen, denen Goldhafer (Gruppe 8) oder Vitamin D_3 (Gruppe 4) gefüttert wurde ($\alpha < 0,10$ bzw. $\alpha < 0,05$). Dagegen unterscheiden sich die Mortalitätsraten dieser beiden Gruppen (Gruppe 4 und 8) nicht signifikant voneinander.

Aus Tabelle 9 sind auch die Serumwerte nach 7 Versuchstagen ersichtlich. Konnte bei einem Küken wegen Serum-mangel die Calciumbestimmung nicht durchgeführt werden, wurde auch der entsprechende Phosphorwert in der Tabelle nicht berücksichtigt. Deshalb unterscheiden sich die angegebenen n_2 -Zahlen teilweise von den n_1 -Zahlen. Aus der Gruppe 8 wurde ein Küken nicht gewertet, da dessen Calciumwert statistisch als Ausreißer zu beurteilen ist.

Beim Betrachten der Serumwerte fällt auf, daß der Phosphorwert der Gruppe 1 (Ca) signifikant niedriger ist ($\alpha < 0,005$) als der von Gruppe 2 (Sr). Wird zur Ca-Ration Vitamin D_3 hinzugegeben (Gruppe 3), steigt der Phosphorspiegel deutlich an und kann nun nicht mehr von den Phosphorwerten der vier Sr-Gruppen unterschieden werden,

die alle im Bereich von 6,2 bis 6,6 mg/100 ml Serum liegen. Auch die P-Konzentration der Gruppe 5 (Ca; 1,25 D₃) unterscheidet sich nicht signifikant von der der Gruppe 6 (Sr; 1,25 D₃). Vergleicht man jedoch die Gruppen 7 (Ca; Goldhafer) und 8 (Sr; Goldhafer) miteinander, so fällt auf, daß der Phosphorspiegel der Sr-gefütterten Küken signifikant höher ist ($\alpha < 0,001$).

Bei den Calciumwerten des Serums können deutlich zwei Ebenen unterschieden werden. Während bei allen vier Ca-Gruppen (Gruppe 1, 3, 5 und 7) die Werte zwischen 9,4 und 11,8 mg/100 ml liegen, finden sie sich bei den Sr-Gruppen im Bereich von 5,7 bis 6,5 mg/100 ml Serum.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß auch der Ätherextrakt aus Goldhafer in der Ca-Diät einen deutlich antirachitischen Effekt ausübt. Dies ist an den Serumwerten und an den Gewichtszunahmen der Gruppe 7 (Ca; Goldhafer) zu erkennen.

Jedoch ist mit Hilfe der Serumwerte keine eindeutige Klärung möglich, ob T. flavescens wie Vitamin D₃ oder 1,25(OH)₂D₃ wirkt (bei einem niederen Phosphorwert der Gruppe 3 wäre eine Charakterisierung möglich gewesen). Lediglich aus den Daten über Gewichtsabnahme und Mortalität der Gruppen 4, 6 und 8 kann im Goldhafer eine Vitamin D₃-ähnliche Wirkung vermutet werden.

Die hohe Gewichtsabnahme und Mortalität der Küken in Gruppe 6 (Sr; 1,25 D₃) deuten wie im Versuch I auf eine erhöhte toxische Wirkung des Strontiums hin, wenn es zusammen mit 1,25(OH)₂D₃ in der Diät vorliegt. Dieser unerwünschte Effekt könnte wiederum mit einer vermehrten Resorption von Strontium in Gegenwart des 1,25(OH)₂-D₃ erklärt werden.

5.3. Versuch III

5.3.1. Versuchsdurchführung

Im Versuch III kamen keine Lohmann Broiler, sondern Leghornküken zur Verwendung. Mit dieser Änderung wurde von den Küken, die Strontium und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Ration erhielten, ein befriedigenderes Serumergebnis erwartet; denn bei Strontiumhemmversuchen mit Küken als Versuchstiere wurden nur Leghornküken verwendet (siehe 2.3. und 3.).

Aufgrund der geringen Wachstumsrate der Leghornküken wurde die Vitamin D-freie Depletionsperiode von zwei auf drei Wochen verlängert.

Die unterschiedlichen Diätvarianten während der Versuchsperiode sind aus der Tabelle 10 ersichtlich. Den Küken der Gruppe 5 (Ca; $1,25\text{ D}_3$) und 6 (Sr; $1,25\text{ D}_3$) wurde das $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ täglich einmal per Schlundsonde mit 0,2 ml Äthanol verabreicht. Damit konnte bei unterschiedlichem Futterverzehr einzelner Tiere eine einheitliche und wirksame Aufnahme der aktiven Substanz garantiert werden. Den Küken der Gruppe 1 (Ca) und 2 (Sr) wurde zur Kontrolle nur Äthanol instilliert.

Tabelle 10

Diätvariablen im Versuch III

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8
Ca (%)	1,0	-	1,0	-	1,0	-	1,0	-
Sr (%)	-	2,2	-	2,2	-	2,2	-	2,2
Vit. D ₃ (I.E./kg)	-	-	1200	1200	-	-	-	-
1,25 D ₃ (mcg tgl. oral)	-	-	-	-	0,5	0,5	-	-
Goldhafer- extr. (%)	-	-	-	-	-	-	30	30

5.3.2. Ergebnisse

Während der 3wöchigen Depletionsperiode zeigten die Leghornküken keine Symptome einer Mangelerkrankung, wie dies bei den vorherigen Versuchen mit Broilern der Fall war.

Erst im Verlauf der 7 Versuchstage wurde wieder ein gruppenweise unterschiedliches Verhalten sichtbar, das dem der Broiler stark ähnelte.

Die Küken der Gruppe 1 (Ca) standen wackelig auf den Beinen und liefen etwas unsicher umher.

Die der Gruppe 3 (Ca; Vit. D₃), 5 (Ca; 1,25 D₃) und 7 (Ca; Goldhafer) verhielten sich dagegen physiologisch.

Die Küken der Gruppe 2 (Sr) konnten nur schlecht stehen und liefen teilweise rückwärts.

In der Gruppe 4 (Sr; Vit. D₃) waren diese Symptome teilweise verstärkt vertreten.

Die Küken der Gruppe 6 (Sr; 1,25 D₃) standen ebenfalls sehr unsicher. Sie zeigten sich schläfrig und begannen unrlötzlich rückwärts zu rutschen.

Die Küken der Gruppe 8 (Sr; Goldhafer) verhielten sich in etwa so wie die der Gruppe 4.

Die Ergebnisse der Tabelle 11 ähneln sehr stark denen der ersten beiden Versuche.

Die Küken der Gruppe 3 (Ca; Vit. D₃), 5 (Ca; 1,25 D₃) und 7 (Ca; Goldhafer) zeigen bei normalem Futterverzehr Zunahmen von 34 bis 36 %. Ohne Vitamin D-ähnlichen Wirkstoff (Gruppe 1) ist die Zunahme der Ca-Gruppe nur etwa halb so groß. Wird in der Versuchsperiode der Calciumgehalt des Futters durch Strontium ersetzt (Gruppe 2), so ist kaum noch eine Gewichtszunahme zu verzeichnen. In Gruppe 4 (Sr; Vit. D₃) und 8 (Sr; Goldhafer) haben die Küken bei einem geringen Futterverbrauch um 13 oder 15 % abgenommen. Mit 1,25(OH)₂D₃ in der Ration (Gruppe 6) verdoppelt sich die Gewichtsabnahme.

Aufschlußreich ist auch die Verteilung der Mortalität in den einzelnen Gruppen. Während in den Ca-Gruppen kein einziges Küken in 7 Versuchstagen starb, verendeten in den Sr-Gruppen 27 von 64 Versuchstieren. Da die Sterblichkeit in den einzelnen Sr-Gruppen unterschiedlich hoch war, wurde sie wie im Versuch II statistisch ausgewertet. Auch hier zeigte sich wieder, daß Strontium zusammen mit 1,25(OH)₂D₃ in der Diät die größte Sterberate induziert. Sie liegt signifikant höher ($\alpha < 0,01$ bzw. $\alpha < 0,001$) als in den Gruppen 8 (Sr; Goldhafer) und 4 (Sr; Vit. D₃). Dagegen unterscheiden sich die Mortalitätsraten dieser beiden Gruppen nicht signifikant voneinander.

Tabelle 11

Ergebnisse aus Versuch III

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8
Gruppen- symbol	Ca	Sr	Ca	Sr	Ca	Sr	Ca	Sr
	-	-	Vit. D ₃	Vit. D ₃	1,25 D ₃	1,25 D ₃	Goldh.	Goldh.
$\bar{x}$ Futterverz. (g/Tier u. Tag)	15	15	19	9	16	7	20	9
$\bar{x}$ Gew.-Zun. (%)	16	1	36	-13	34	-29	35	-15
Mortalität (%)	0	0	0	31	0	94	0	44
n_1	16	16	16	11	16	1	16	9
$\bar{x}$ Serum P	3,7	4,4	5,4	5,0	5,3	7,5	4,5	4,7
$\pm s$	$\pm 0,9$	$\pm 1,1$	$\pm 1,3$	$\pm 1,0$	$\pm 1,0$		$\pm 1,0$	$\pm 0,5$
(mg/100 ml)								
$\bar{x}$ Serum Ca	9,4	8,4	10,0	8,3	9,7	7,1	9,6	7,5
$\pm s$	$\pm 0,5$	$\pm 0,5$	$\pm 0,4$	$\pm 0,6$	$\pm 0,5$		$\pm 0,4$	$\pm 0,4$
(mg/100 ml)								
n_2	15	16	16	11	16	1	16	7

Beim Vergleich der Phosphorwerte von Gruppe 1 (Ca) und 2 (Sr) ist der signifikant niedrige Wert der Ca-Gruppe auffällig ($\alpha < 0,025$). Dagegen ist zwischen dem Phosphorspiegel der Gruppe 3 (Ca; Vit. D_3) und 4 (Sr; Vit. D_3) kein Unterschied feststellbar. Auch die beiden Phosphorkonzentrationen der Gruppe 7 (Ca; Goldhafer) und 8 (Sr; Goldhafer) unterscheiden sich nicht merklich voneinander. Ein ähnlicher Vergleich zwischen der Gruppe 5 (Ca; 1,25 D_3) und 6 (Sr; 1,25 D_3) läßt sich kaum anstellen, da in der Sr-Gruppe nur ein Küken überlebte. Auffallend ist ferner, daß der Phosphorwert der Gruppe 1 (Ca) signifikant niedriger ist als in den Ca-Gruppen mit Vit. D_3 , 1,25(OH) $_2D_3$ oder Goldhafer ($\alpha < 0,01$ bis $\alpha < 0,001$).

Bei den Calciumwerten des Serums können wieder deutlich zwei Gruppierungen unterschieden werden. Während bei allen vier Ca-Gruppen die Werte zwischen 9,4 und 10,0 mg/100 ml Serum liegen, finden sie sich in den Sr-Gruppen im Bereich von 7,1 bis 8,4 mg/100 ml.

Faßt man die Ergebnisse zusammen, so läßt sich an den Werten der Tabelle 11 auch bei Leghornküken ein antirachitischer Effekt des T. flavescens erkennen. Aus den Serumwerten ist keine Aussage über eine Charakterisierung der Goldhaferwirkung möglich. Denn bei einem Vergleich der entsprechenden Gruppen sind keine signifikanten Unterschiede der P-Konzentrationen ersichtlich. Somit scheinen die Leghornküken bei dieser Versuchsanordnung nicht geeignet zu sein, eine evtl. Hemmbarkeit der Trisetumaktivität mit Hilfe des Phosphorwertes nachzuweisen. Lediglich aus den Werten der Gewichtsabnahme und Mortalität der Gruppen 4, 6 und 8 läßt sich im Goldhafer eine Vitamin D_3 -ähnliche Wirkung vermuten. Auch bei Leghornküken entfaltet Strontium in Verbindung mit 1,25(OH) $_2D_3$ eine hohe toxische Wirkung, die an den

Bewegungsstörungen, der enormen Gewichtsabnahme und Mortalität zu erkennen ist.

5.4. Versuch IV

5.4.1. Versuchsdurchführung

Da die Serumwerte des Leghorn-Versuches ungenügende Resultate lieferten, wurde der Versuch IV wieder mit Lohmann Broilern durchgeführt. Um die Mortalität abzusenken, wurde die Depletionsperiode auf 10 und die Versuchsperiode auf 5 Tage verkürzt. Außerdem wurde diesmal bei den Sr-gehemmten Küken der Calciumgehalt des Futters nicht vollständig durch Strontium ersetzt (siehe Tab. 12). Damit sollten die rachitischen Erscheinungen, die möglicherweise auf einem absoluten Calciummangel beruhten, bei den Küken der Gruppe 6 (Sr; 1,25 D₃) beseitigt werden.

Das 1,25(OH)₂D₃ wurde auch diesmal oral verabreicht.

Tabelle 12

Diätvariablen im Versuch IV

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8
Ca (%)	1,0	0,4	1,0	0,4	1,0	0,4	1,0	0,4
Sr (%)	-	1,32	-	1,32	-	1,32	-	1,32
Vit. D ₃ (I.E./kg)	-	-	1200	1200	-	-	-	-
1,25 D ₃ (mcg tgl. oral)	-	-	-	-	0,5	0,5	-	-
Goldhafer- extr. (%)	-	-	-	-	-	-	30	30

5.4.2. Ergebnisse

Die Küken konnten nach 10tägiger Depletionsperiode nur noch unsicher und wackelig stehen.

Nach den anschließenden 5 Versuchstagen wurden wieder unterschiedlich stark ausgeprägte Symptome sichtbar.

Allgemein konnte man feststellen, daß die Küken in den einzelnen Gruppen das gleiche Verhalten zeigten, das bereits im Versuch II und III geschildert wurde. Lediglich die Küken der Gruppe 6 (Sr; 1,25 D₃) machten eine Ausnahme. Sie konnten diesmal wesentlich besser stehen und laufen als die Broiler der übrigen Sr-Gruppen. So lebhaft wie die Küken der Gruppe 3 (Ca; Vit. D₃) oder 5 (Ca; 1,25 D₃) waren sie jedoch nicht.

Die Ergebnisse der Tabelle 13 lassen zum Teil wesentliche Unterschiede zu den bisherigen Versuchsergebnissen erkennen.

Die Küken der Gruppe 3 (Ca; Vit. D₃), 5 (Ca; 1,25 D₃) und 7 (Ca; Goldhafer) weisen bei einem physiologischen Futterverbrauch auch die besten Zunahmen auf. Ohne Vitamin D-ähnlichen Wirkstoff (Gruppe 1) ist die Gewichtszunahme nur etwa halb so groß. Bei den Sr-Gruppen ist auffallend, daß diesmal keine Gewichtsabnahmen zu verzeichnen sind. Bei höherem Futterverzehr als in den letzten Versuchen werden sogar beachtliche Zunahmen erreicht, die in der Gruppe 4 (Sr; Vit. D₃) und 8 (Sr; Goldhafer) mit 21 bzw. 20 % angegeben sind.

Die Küken der Gruppe 2 (Sr) und 6 (Sr; 1,25 D₃) nehmen nur etwa halb so gut zu.

Beim Betrachten der Mortalitätsangaben sind nur 2 gestorbene Küken aus der Gruppe 1 (Ca) festzustellen. Diese beiden verendeten bereits am ersten Versuchstag.

Zwischen den Phosphorwerten der Gruppe 1 (Ca) und 2 (Sr) ist kein signifikanter Unterschied ersichtlich. Dagegen liegt in Gruppe 4 (Sr; Vit. D₃) die Phosphorkonzentration deutlich höher ($p < 0,01$) als in Gruppe 3 (Ca; Vit. D₃). Auch beim Vergleich der Gruppe 7 (Ca; Goldhafer) und 8 (Sr; Goldhafer) ist ein signifikanter Anstieg des Phosphorspiegels auffällig ($p < 0,001$). Dagegen ist bei den Phosphorwerten der Gruppe 5 (Ca; 1,25 D₃) und 6 (Sr; 1,25 D₃) kein statistischer Unterschied feststellbar. Vergleicht man die Phosphorkonzentrationen untereinander, so fällt der signifikant niedrigere Wert der Gruppe 6 (Sr; 1,25 D₃) im Vergleich zur Gruppe 8 ($p < 0,001$) und Gruppe 4 ($p < 0,005$) auf. Dagegen besteht im P-Spiegel der beiden Sr-Gruppen mit Vitamin D₃ oder Goldhafer kein statistischer

Tabelle 13

Ergebnisse aus Versuch IV

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8
Gruppen- symbol	Ca	Sr	Ca	Sr	Ca	Sr	Ca	Sr
	-	-	Vit. D ₃	Vit. D ₃	1,25 D ₃	1,25 D ₃	Goldh.	Goldh.
$\bar{x}$ Futterverz. (g/Tier u. Tag)	19	19	27	24	29	18	24	26
$\bar{x}$ Gew.-Zun. (%)	15	11	33	21	30	10	24	20
Mortalität (%)	13	0	0	0	0	0	0	0
n_1	14	16	16	16	16	16	16	16
$\bar{x}$ Serum P $\pm s$ (mg/100 ml)	6,4 $\pm 1,5$	7,2 $\pm 1,1$	5,3 $\pm 0,9$	7,2 $\pm 0,9$	5,2 $\pm 1,1$	6,1 $\pm 0,8$	4,9 $\pm 1,7$	7,5 $\pm 1,6$
$\bar{x}$ Serum Ca $\pm s$ (mg/100 ml)	11,8 $\pm 1,2$	11,1 $\pm 0,9$	13,9 $\pm 0,9$	12,2 $\pm 0,8$	13,1 $\pm 0,8$	11,5 $\pm 0,9$	13,3 $\pm 1,7$	11,4 $\pm 1,1$
n_2	10	16	16	16	16	16	15	16

Unterschied.

Bei den Calciumwerten können wieder deutlich zwei Bereiche unterschieden werden. Während bei allen Ca-Gruppen mit Vitamin D-ähnlichem Wirkstoff der Serumwert zwischen 13,1 und 13,9 mg/100 ml liegt, ist er bei den Sr-Gruppen und der Ca-Gruppe ohne Vitamin D (Gruppe 1) wesentlich niedriger (11,1 - 12,2 mg/100 ml).

Aus der Zusammenfassung aller Ergebnisse des Versuchs IV können gegenüber früheren Versuchen wichtige Erkenntnisse gewonnen werden. Durch die Kürzung der Versuchsdauer und den Restgehalt an Calcium in den Strontium-Diäten gelang es, die Mortalität der Küken während der Versuchsdauer zu unterdrücken. Außerdem können nun in den Sr-Gruppen keine Gewichtsabnahmen, sondern beachtliche Zunahmen verzeichnet werden. Auch die Serumergebnisse liefern diesmal eindeutige Resultate. Mit Hilfe des Phosphorwertes ist es vermutlich möglich, die Wirkung des aktiven Faktors im Goldhafer zu charakterisieren. Während die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Aktivität durch Strontium im Futter nicht beeinflusst wird, werden T. flavescens und Vitamin D_3 in ihrer antirachitischen Wirkung von Strontium gehemmt, welches am ansteigenden P-Spiegel ersichtlich wird. Damit ist ein deutlicher Wirkungsunterschied von Goldhafer zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, nicht aber zu Vitamin D_3 erkennbar.

5.5. Versuch V

5.5.1. Versuchsdurchführung

Da sich die Calcium- und Strontiumkonzentrationen des Futters im Versuch IV bewährten, wurden sie auch diesmal wieder eingesetzt (siehe Tab. 14). Aus technischen Gründen mußte die Depletionsperiode auf 12 und die Versuchsdauer auf 6 Tage verlängert werden. Weitere Versuchsgruppen mit EHDP-Verabreichung (Äthan-1-Hydroxy-1,1-Diphosphonat) sollten das aktive Prinzip im Goldhafer charakterisieren helfen (siehe 2.4. und 4.4.).

Bei den Küken der Sr-Gruppen wurde zusätzlich noch der Strontiumgehalt im Serum bestimmt, da unterschiedliche Konzentrationen vermutet wurden (siehe 4.6.2.).

Mit der Bestimmung des Calcium-bindenden Proteins (CaBP) in der Dünndarmmukosa (siehe 4.6.3.) versuchte man nachzuweisen, daß der Phosphorwert des Serums als Kriterium für die Zuordnung der Trisetumaktivität ausreicht.

Tabelle 14

Diätvariablen im Versuch V

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ca (%)	1,0	0,4	1,0	1,0	0,4	1,0	1,0	0,4	1,0	1,0	0,4	1,0
Sr (%)	-	1,32	-	-	1,32	-	-	1,32	-	-	1,32	-
EHDP (mg tgl. s.c.)	-	-	5	-	-	5	-	-	5	-	-	5
Vit. D ₃ (I.E./kg)	-	-	-	1200	1200	1200	-	-	-	-	-	-
1,25 D ₃ (mcg tgl. oral)	-	-	-	-	-	-	0,5	0,5	0,5	-	-	-
Goldhafer- extr. (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	30	30

5.5.2. Ergebnisse

Nach der Vit. D-freien Depletionsperiode zeigten die Küken die gleichen Symptome, die bereits bei anderen Broilerversuchen dargestellt wurden.

Das unterschiedliche Verhalten der Tiere in den Ca- und Sr-Gruppen glich nach der Versuchsperiode ebenfalls dem im Versuch IV geschilderten.

Die Broiler der Gruppe 3 (EHDP) und 6 (EHDP; Vit. D₃) konnten nur wackelig stehen und sich unsicher fortbewegen.

In Gruppe 9 dagegen (EHDP; 1,25 D₃) liefen die Küken wesentlich sicherer.

Die Tiere der Gruppe 12 (EHDP; Goldhafer) standen so unsicher wie die in Gruppe 3 oder 6.

Bei den Daten über Futterverzehr und Gewichtszunahme in den Tabellen 15 a und 15 b fällt auf, daß die vergleichbaren Ca- und EHDP-Gruppen bei etwa gleichem Futterverbrauch auch die besten Zunahmen verzeichnen. Ohne Vitamin D sind, wie bei früheren Versuchen, die Gewichtszunahmen geringer. Auch bei den Sr-Gruppen sind diesmal wieder keine Gewichtsabnahmen zu verzeichnen. Die schlechteste Zunahme ist in Gruppe 8 (Sr; 1,25 D₃) mit 14 % festzustellen, während die Gruppe 11 (Sr; Goldhafer) mit 42 % noch bessere Gewichtszunahmen aufzuweisen hat als Gruppe 5 (Sr; Vit. D₃) mit 36 %.

Die Daten über die Sterblichkeit der Küken lassen wie im letzten Versuch kaum nennenswerte Verluste erkennen.

Zwischen den Serum-Phosphorwerten der Gruppe 1 (Ca), 2 (Sr) und 3 (EHDP) ist kein signifikanter Unterschied ersichtlich. Vergleicht man jedoch die Gruppe 4 (Ca, Vit. D₃) und 5 (Sr; Vit. D₃), so fällt ein deutlicher Anstieg des Phosphorspiegels bei den Sr-Küken auf

($\alpha < 0,10$). Ein entsprechender Unterschied liegt auch dann vor, wenn statt Vitamin D_3 Goldhafer verabreicht wird ($\alpha < 0,05$). Wird den Kühen dagegen $1,25(OH)_2D_3$ gegeben (Gruppe 7 und 8), kann man keine signifikanten Differenzen der Phosphorwerte mehr feststellen. Werden den Ca-Gruppen mit Vitamin D-ähnlichem Wirkstoff die vergleichbaren EHDP-Gruppen gegenübergestellt, ist ebenfalls ein deutlicher Anstieg des Phosphorspiegels nach Diphosphonatbehandlung auffällig. Dieser Unterschied ist zu finden, wenn Vitamin D_3 ($\alpha < 0,025$), $1,25(OH)_2D_3$ ($\alpha < 0,05$) oder Goldhafer ($\alpha < 0,001$) im Versuchsfutter enthalten ist. Dabei ist interessant, daß die Gruppe 9 (EHDP; $1,25 D_3$) mit 7,5 mg/100 ml den signifikant niedrigsten Phosphorwert aller EHDP-Gruppen aufweist. Zwischen der Phosphorkonzentration der Gruppe 6 (EHDP; Vit. D_3) und 12 (EHDP; Goldhafer) mit 10,8 bzw. 11,2 mg/100 ml ist kein statistischer Unterschied ersichtlich.

Faßt man die Calciumwerte der Ca-Gruppen mit Vitamin D-ähnlichem Wirkstoff zusammen, so liegen die Werte im Bereich von 13,0 bis 13,7 mg Ca/100 ml Serum. Auch bei den vergleichbaren EHDP-Gruppen liegt der Ca-Wert auf diesem Niveau (12,0 - 13,3 mg/100 ml). Bei den Sr-Gruppen ist der Calciumspiegel des Serums dagegen niedriger (10,2 - 11,7 mg/100 ml).

Bei den Strontiumwerten des Serums ist auffällig, daß in der Gruppe 11 (Sr; Goldhafer) der Serumwert am niedrigsten (5,2 mg/100 ml) und in der Gruppe 8 (Sr; $1,25 D_3$) mit 13,5 mg/100 ml am höchsten ist.

In den Tabellen 15 a und b wird auch der CaBP-Gehalt der Dünndarmmukosa in % der Radioaktivität im Überstand pro mg Gesamtprotein angegeben (siehe auch 4.6.3.). Während die n_2 -Zahlen nur für die CaBP-Bestimmung zutreffen, beziehen sich die n_1 -Zahlen auf alle übrigen Werte. Den

Tabelle 15 a: Ergebnisse aus Versuch V

Gruppe	1	2	3	4	5	6
Gruppen- symbol	Ca	Sr	EHDP	Ca Vit. D ₃	Sr Vit. D ₃	EHDP Vit. D ₃
$\bar{x}$ Futterverz. (g/Tier u. Tag)	19	21	23	24	23	27
$\bar{x}$ Gew.-Zun. (%)	29	28	32	45	36	44
Mortalität (%)	19	0	0	0	0	0
$\bar{x}$ Serum P a)	8,1	9,1	9,2	8,1	9,5	10,8
$\pm s$	$\pm 2,5$	$\pm 4,0$	$\pm 2,6$	$\pm 3,3$	$\pm 3,1$	$\pm 3,6$
$\bar{x}$ Serum Ca a)	8,8	9,4	12,7	13,7	10,6	12,0
$\pm s$	$\pm 1,3$	$\pm 0,9$	$\pm 0,9$	$\pm 1,0$	$\pm 0,7$	$\pm 0,7$
$\bar{x}$ Serum Sr a)	-	9,3	-	-	8,0	-
$\pm s$	-	$\pm 1,2$	-	-	$\pm 1,2$	-
n ₁	10	12	12	12	12	12
$\bar{x}$ CaBP b)	9,17	0,25	0,14	1,88	0,18	0,55
n ₂	3	4	4	4	4	4

a) Die Serumwerte sind in mg/100 ml angegeben.

b) Die Einheiten der CaBP-Konzentrationen resultieren aus den % der Radioaktivität im Überstand, bezogen auf die Gesamtaktivität, pro mg Gesamtprotein.

Tabelle 15 b: Ergebnisse aus Versuch V

Gruppe	7	8	9	10	11	12
Gruppen- symbol	Ca 1,25 D ₃	Sr 1,25 D ₃	EHDP 1,25 D ₃	Ca Goldh.	Sr Goldh.	EHDP Goldh.
$\bar{x}$ Futterverz. (g/Tier u. Tag)	26	17	23	26	26	27
$\bar{x}$ Gew.-Zun. (%)	42	14	40	39	42	46
Mortalität (%)	6	0	13	0	0	6
$\bar{x}$ Serum P a)	6,3 ± 1,2	5,8 ± 0,7	7,5 ± 1,6	6,6 ± 2,9	8,0 ± 1,0	11,2 ± 3,5
$\bar{x}$ Serum Ca a)	13,1 ± 1,0	10,2 ± 0,9	12,8 ± 1,6	13,0 ± 0,7	11,7 ± 0,6	13,3 ± 0,9
$\bar{x}$ Serum Sr a)	-	13,5 ± 1,9	-	-	5,2 ± 0,8	-
n ₁	12	12	11	12	12	12
$\bar{x}$ CaBP b)	2,03	1,62	1,81	1,57	0,24	0,67
n ₂	3	4	3	4	4	3

a) siehe Tabelle 15 a

b) siehe Tabelle 15 a

Angaben über das Calcium-bindende Protein ist zu entnehmen, daß in den Gruppen 4 (Ca; Vit. D_3) und 10 (Ca; Goldhafer) und bei den Küken mit $1,25(OH)_2D_3$ in der Futterration (Gruppe 7, 8 und 9) das CaBP in einer verhältnismäßig hohen Konzentration vorliegt (1,57 - 2,03 %). Bei allen anderen Gruppen liegt der CaBP-Wert unter 0,67 %. In den beiden Sr-Gruppen mit Vitamin D_3 oder Goldhafer (Gruppe 5 und 11) liegt er sogar unter 0,24 % der im Überstand gefundenen Radioaktivität.

Die Ergebnisse der Phosphorwerte von Versuch V bestätigen die im Versuch IV aufgestellte Vermutung, daß die Trisetumaktivität nicht durch eine $1,25(OH)_2D_3$ -ähnliche Wirkung bestimmt wird. Denn der Serum-P-Spiegel der Küken zeigt nach Strontiumfütterung sowohl bei Goldhafer- als auch bei Vitamin D_3 -Gabe einen deutlichen Anstieg, welcher als rachitische Erscheinung zu deuten ist. Durch Verabreichen von $1,25(OH)_2D_3$ wird die Strontiumhemmung umgangen und der Phosphorwert steigt infolgedessen nicht an.

Auch die Hemmversuche mit EHDP lassen im Goldhafer mehr eine Vitamin D_3 -artige Wirkung erkennen.

Die Konzentrationsangaben des CaBP bestätigen ebenfalls die mit Hilfe der Phosphorwerte gefundenen Erkenntnisse. Denn es ist deutlich zu sehen, daß in den Sr- oder EHDP-Gruppen mit Vitamin D_3 (Gruppe 5 und 6) oder mit Goldhafer (Gruppe 11 und 12) die CaBP-Produktion stark gehemmt ist, während bei $1,25(OH)_2D_3$ in der Ration (Gruppe 8 und 9) die CaBP-Konzentration kaum vermindert wird. Deutlich ist auch eine Beziehung zwischen einem hohen Phosphor- und einem niederen CaBP-Wert ersichtlich.

Relativ hoch ist allerdings der Phosphorspiegel der Gruppe 4 (Ca; Vit. D_3), der sich nicht von dem der rachitischen Ca-Gruppe unterscheidet. Dieser Wert kommt durch

extrem hohe Einzelwerte von 11,0 bis 13,6 mg/100 ml zustande, die bei vier von zwölf Küken dieser Gruppe festgestellt wurden und nicht erklärbar sind. Ohne Berücksichtigung dieser Extremwerte würde man einen Mittelwert von 6,0 mg P/100 ml Serum erhalten, der nun dem der Gruppe 7 (Ca; 1,25 D₃) und 10 (Ca; Goldhafer) vergleichbar wäre.

In diesem Versuch sind auch die allgemein hohen Phosphorwerte mit teilweise größeren Standardabweichungen auffällig, die nur mit veränderten apparativen Meßbedingungen erklärt werden können.

5.6. Versuch VI

5.6.1. Versuchsdurchführung

Nachdem in den letzten beiden Versuchen der Nachweis einer dem Vitamin D₃-ähnlichen Wirkung des Goldhafers gelang, konnte nun auf Versuchsgruppen mit 1,25(OH)₂D₃ in der Ration verzichtet werden. Um bei den Serumwerten eine evtl. Abhängigkeit von verschiedenen Vitamin D₃- oder Goldhaferkonzentrationen feststellen zu können, wurden die beiden Wirkstoffe in unterschiedlichen Mengen dem Futter zugegeben (siehe Tab. 16).

Außerdem wurde allen Küken am 2. und 3. Versuchstag 1000 ppm Chlortetracyclin mit dem Futter verabreicht. Mit Hilfe der dadurch auftretenden Knochenfluoreszenz sollte der Einfluß von Strontium und EHDP auf die Knochenmineralisation nachgewiesen werden (siehe 4.6,5.).

Tabelle 16

Diätvariablen im Versuch VI

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8
Ca (%)	1,0	0,4	1,0	1,0	0,4	1,0	1,0	0,4
Sr (%)	-	1,32	-	-	1,32	-	-	1,32
EHDP (mg tgl. s.c.)	-	-	5	-	-	5	-	-
Vit. D ₃ (I.E./kg)	-	-	-	600	600	600	1200	1200
=====								
Gruppe	9	10	11	12	13	14	15	
Ca (%)	1,0	1,0	0,4	1,0	1,0	0,4	1,0	
Sr (%)	-	-	1,32	-	-	1,32	-	
EHDP (mg tgl. s.c.)	5	-	-	5	-	-	5	
Vit. D ₃ (I.E./kg)	1200	-	-	-	-	-	-	
Goldhafer- extr. (%)	-	15	15	15	30	30	30	

5.6.2. Ergebnisse

Nach der Depletionsperiode zeigten alle Küken die bereits bei anderen Broilerversuchen geschilderten Mangelsymptome.

Nach 5 Versuchstagen konnten die Küken der Gruppe 1 (Ca) nur unsicher stehen und laufen.

Dagegen machten die Tiere in allen übrigen Ca-Gruppen (Gruppe 4, 7, 10 und 13) einen gesunden Eindruck.

Die Broiler in den Sr- und EHDP-Gruppen bewegten sich jedoch wieder unbeholfen und unsicher fort.

In den Tabellen 17 a und b sind die Ergebnisse dieses Versuches dargestellt.

Werden die Daten über Futterverzehr und Gewichtszunahme der Ca-Gruppen mit den entsprechenden Sr-Gruppen verglichen, so fällt nach Vitamin D_3 - oder 15 % Goldhaferzugabe bei den Sr-Gruppen eine schlechtere Zunahme auf. Lediglich bei 30 % T. flavescens im Futter (Gruppe 13 und 14) nehmen die Küken beider Gruppen um 34 % zu. Ohne Trisetum oder Vitamin D_3 ist sogar in der Sr-Gruppe eine bessere Gewichtszunahme als in der Ca-Gruppe zu verzeichnen (Gruppe 1 und 2). Bei einem Vergleich der Ca-Gruppen mit den entsprechenden EHDP-Gruppen ist die um 3 bis 13 % höhere Zunahme der mit EHDP gehemmten Küken auffällig.

Wie aus den Angaben über die Sterblichkeit ersichtlich ist, verendeten während der Versuchsdauer nur in der Gruppe 1 zwei Küken.

In Tabelle 17 a und b sind auch die Serumwerte und die CaBP-Gehalte der Dünndarmmukosa angegeben. Die n_3 -Zahlen beziehen sich auf die CaBP-Bestimmung, die diesmal nur bei den Ca- und Sr-Gruppen durchgeführt wurde. Für die Serumwerte gelten die n_2 -Zahlen. Da die Calciumbestimmung teilweise wegen Serummangel nicht mehr durch-

Tabelle 17 a: Ergebnisse aus Versuch VI

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8
Gruppen- symbol	Ca	Sr	EHDP	Ca 600 D ₃	Sr 600 D ₃	EHDP 600 D ₃	Ca 1200 D ₃	Sr 1200 D ₃
$\bar{x}$ Futterverz. (g/tier u. Tag)	19	22	23	23	21	24	22	24
$\bar{x}$ Gew.- Zun. (%)	27	31	36	35	25	40	31	27
Mortalität (%)	13	0	0	0	0	0	0	0
n_1	11	12	16	12	12	16	12	12
$\bar{x}$ Serum P a)	6,3	7,5	7,3	4,4	6,5	7,6	4,3	6,7
$\pm s$	$\pm 1,5$	$\pm 1,2$	$\pm 1,1$	$\pm 0,9$	$\pm 1,2$	$\pm 1,3$	$\pm 0,8$	$\pm 1,3$
$\bar{x}$ Serum Ca a)	7,9	10,1	13,2	13,0	9,8	14,2	13,3	10,1
$\pm s$	$\pm 1,5$	$\pm 0,9$	$\pm 1,1$	$\pm 1,6$	$\pm 1,8$	$\pm 0,8$	$\pm 1,8$	$\pm 1,2$
$\bar{x}$ Serum Sr a)	-	7,7	-	-	7,8	-	-	7,3
$\pm s$	-	$\pm 1,3$	-	-	$\pm 3,3$	-	-	$\pm 0,7$
n_2	11	11	16	12	12	16	12	12
$\bar{x}$ CaBP b)	0,21	0,15	-	1,35	0,24	-	1,83	0,33
n_3	3	4	-	4	4	-	4	4

a) Die Serumwerte sind in mg/100 ml angegeben.

b) Die Einheiten der CaBP-Konzentrationen resultieren aus den % der Radioaktivität im Überstand, bezogen auf die Gesamtaktivität, pro mg Gesamtprotein.

Tabelle 17 b: Ergebnisse aus Versuch VI

Gruppe	9	10	11	12	13	14	15
Gruppen- symbol	EHPD 1200 D ₃	Ca 15%G.H.	Sr 15%G.H.	EHPD 15%G.H.	Ca 30%G.H.	Sr 30%G.H.	EHPD 30%G.H.
$\bar{x}$ Futterverz. (g/Tier u. Tag)	28	26	19	26	21	23	25
$\bar{x}$ Gew.-Zun. (%)	44	37	25	40	34	34	41
Mortalität (%)	0	0	0	0	0	0	0
n_1	16	12	12	16	12	12	16
$\bar{x}$ Serum P a)	7,3 ± 1,0	4,4 ± 0,9	7,4 ± 1,1	7,0 ± 1,1	4,6 ± 1,2	7,2 ± 1,1	7,3 ± 1,2
$\bar{x}$ Serum Ca a)	14,0 ± 0,9	13,6 ± 1,3	10,3 ± 1,2	13,8 ± 1,0	13,2 ± 1,2	11,3 ± 0,9	14,0 ± 0,9
$\bar{x}$ Serum Sr a)	-	-	7,7 ± 3,0	-	-	6,1 ± 1,4	-
n_2	15	12	10	16	12	12	16
$\bar{x}$ CaBP b)	-	1,11	0,37	-	1,55	0,35	-
n_3	-	4	4	-	4	4	-

a) und b) siehe Tabelle 17 a

föhrbar war, unterscheiden sich diese n_2 -Zahlen bei drei Gruppen von den n_1 -Zahlen.

Die Phosphorwerte der Ca-, Sr- und EHDP-Gruppen ohne Vitamin D_3 oder Goldhafer (Gruppe 1, 2 und 3) unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Wird dem Kükenfutter Vitamin D_3 oder Trisetum in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt, so sinkt der Phosphorspiegel in den Ca-Gruppen auf Werte von 4,3 bis 4,6 mg/100 ml ab. Nun differiert er signifikant von dem der vergleichbaren Sr- und EHDP-Gruppen (von $p < 0,1$ bis $p < 0,001$), bei denen er im Bereich von 6,5 bis 7,6 mg P/100 ml Serum liegt.

Bei den Calciumwerten fällt zwischen der Gruppe 1 (Ca) und 2 (Sr) kein statistischer Unterschied auf, der jedoch im Vergleich zur Gruppe 3 (EHDP) signifikant wird ($p < 0,001$). Wird den Kükern der Ca-Gruppen Vitamin D_3 oder Goldhafer verabreicht (Gruppe 4, 7, 10 und 13), so steigen die Ca-Werte im Vergleich zu dem der Gruppe 1 signifikant auf 13,0 bis 13,6 mg/100 ml an ($p < 0,001$). Auch die Calciumspiegel der EHDP-Gruppen (Gruppe 6, 9, 12 und 15) liegen in diesem Bereich und lassen sich statistisch nicht von denen der vergleichbaren Ca-Gruppen unterscheiden. Wie in den EHDP-Gruppen tritt auch bei den Sr-Gruppen keine Änderung des Ca-Wertes durch Vitamin D_3 - oder Goldhaferzusatz ein. In den Sr-Gruppen mit Vitamin D_3 oder 15 % Goldhaferextrakt ist der Calciumspiegel signifikant niedriger als in den entsprechenden Ca-Gruppen.

Bei den Strontiumwerten fällt auf, daß dieser in der Gruppe 14 (Sr; 30 % Goldhafer) mit 6,1 mg/100 ml niedriger liegt als in den anderen Gruppen (7,3 - 7,7 mg/100 ml).

Bei den Ergebnissen der CaBP-Bestimmung sind wie im letzten Versuch zwei verschiedene Konzentrationen des Proteinanteils erkennbar. Bei den Ca-Gruppen mit Vitamin D_3 oder Goldhafer (Gruppe 4, 7, 10 und 13) liegt

der CaBP-Wert im Bereich von 1,11 bis 1,83 %, während er in der Gruppe 1 (Ca) und in den Sr-Gruppen mindestens unter 0,37 % absinkt.

Die Tabellen 18 a und b enthalten die Daten der Tibiafluoreszenz nach der Chlortetracyclinmarkierung (siehe 4.6.5.).

Die Gruppen ohne Vitamin D oder Goldhafer (Gruppe 1, 2 und 3) zeigen eine schwächere Fluoreszenz als die Gruppen mit diesen Zusätzen. Dabei leuchten die Knochen der Gruppe 2 (Sr) noch stärker als die der beiden anderen Gruppen. Nach Zugabe von 600 oder 1200 I.E. Vitamin D₃ pro kg Futter verstärkt sich die Fluoreszenz bei allen Gruppen unabhängig von der Vitamin D₃-Dosierung. Auch hier nimmt die Fluoreszenzstärke in der Reihenfolge Sr-, Ca- und EHDP-Gruppe ab. Mit 15 % Goldhaferextrakt leuchten die Knochen der Ca-Gruppe (Gruppe 10) stärker als mit 30 % und genauso stark wie mit 600 bzw. 1200 I.E. Vitamin D₃. Dagegen fluoreszieren die Tibien der Sr-Gruppen mit 30 % Extrakt (Gruppe 14) kräftiger als mit 15 % (Gruppe 11), welche sogar noch wesentlich schwächer als die der Gruppe 2 (Sr) leuchten. Die Knochen der EHDP-Gruppe mit 30 % Trisetumextrakt (Gruppe 15) sind etwas stärker in der Fluoreszenz als die der Gruppe 12 (EHDP; 15 % Goldhafer) und damit genauso einzustufen wie nach den Vitamin D₃-Dosierungen (Gruppe 6 und 9). Stellt man bei den Gruppen mit 15 % Goldhaferextrakt eine Reihung der Fluoreszenzstärke auf, so leuchten die Tibien der Ca-Gruppe stärker als die der EHDP- oder Sr-Gruppe. Mit 30 % Extrakt fluoreszieren die Knochen der Sr-Gruppe am stärksten und die der Ca-Gruppe am schwächsten.

In den Reihen D und E fällt auf, daß die Länge der leuchtenden und die der Gesamtspongiosa in den Ca-Grup-

Tabelle 18 a

Makroskopische Beurteilung der Tibiafluoreszenz nach Chlortetracyclinmarkierung

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8
Gruppen- symbol	Ca	Sr	EHDP	Ca	Sr	EHDP	Ca	Sr
	-	-	-	600 D ₃	600 D ₃	600 D ₃	1200 D ₃	1200 D ₃
Querschnitt durch die Diaphysenmitte	A	IV	II	IV	IV	III	IV	IV
	B	IV	II	IV	IV	III	IV	IV
Längsschnitt durch die proximale Dia- u. Metaphyse	C	I	III	II	III	IV	III	IV
	D	5,2	6,2	4,5	5,8	6,3	5,7	6,1
	E	9,7	12,1	10,7	11,5	11,8	11,6	11,9
n		8	11	15	11	10	12	11

Legende:

A: Fluoreszenzintensität des Querschnittes	I: sehr schwache Fluoreszenz
B: Fluoreszenzbreite des Querschnittes	II: schwache Fluoreszenz
C: Fluoreszenzintensität des Längsschnittes	III: mittlere Fluoreszenz
D: Länge der fluoreszierenden Spongiosa in mm	IV: starke Fluoreszenz
E: Länge der Gesamtspongiosa in mm	

Tabelle 18 b

Makroskopische Beurteilung der Tibiafluoreszenz nach Chlortetracyclinmarkierung

Gruppe	9	10	11	12	13	14	15
Gruppen- symbol	EHDP 1200 D ₃	Ca 15 % G.H.	Sr 15 % G.H.	EHDP 15 % G.H.	Ca 30 % G.H.	Sr 30 % G.H.	EHDP 30 % G.H.
Querschnitt durch die Diaphysenmitte	A III III	IV IV IV	III III III	III III III	III III III	IV IV IV	III III III
Längsschnitt durch die proximale Dia- u. Metaphyse	C IV D E	III IV 5,9 12,2	III III 6,5 12,0	III III 7,1 13,1	III III 5,5 12,0	III III 7,2 12,2	IV IV 5,2 11,5
n	15	11	10	14	10	11	13

Legende:

- A: Fluoreszenzintensität des Querschnittes
 B: Fluoreszenzbreite des Querschnittes
 C: Fluoreszenzintensität des Längsschnittes
 D: Länge der fluoreszierenden Spongiosa in mm
 E: Länge der Gesamtspongiosa in mm

III: mittlere Fluoreszenz

IV: starke Fluoreszenz

pen mit der Zugabe von Vitamin D₃ oder Trisetum kontinuierlich zunimmt. Vergleicht man die Längen der fluoreszierenden Spongiosa der Sr-, Ca- und EHDP-Gruppen, so ist bei jeweils gleichen Vitamin D- oder Goldhaferzusätzen (Ausnahme 30 % Goldhaferextrakt) die fluoreszierende Spongiosa der Sr-Gruppen um einige 1/10 mm länger als die der Ca- oder EHDP-Gruppen.

Faßt man die Ergebnisse aller Tabellen dieses Versuches zusammen, so sind überraschenderweise bei den EHDP-gehemmten Gruppen bessere Zunahmen als bei den vergleichbaren Ca-Gruppen zu sehen. Nach den Serum- und CaBP-Werten zu schließen, ist auch in diesem Versuch wieder die Goldhaferwirkung mit Vitamin D₃ zu vergleichen. Denn beide antirachitische Wirkstoffe werden durch Strontium oder EHDP gehemmt. Dies ist an den angestiegenen Phosphor- und abgefallenen CaBP-Werten ersichtlich.

Eine Abhängigkeit der Serumwerte von unterschiedlichen Vitamin D₃- oder Goldhaferkonzentrationen kann nach 5 Versuchstagen nicht gefunden werden. Jedoch nehmen die CaBP-Gehalte in den Ca-Gruppen mit steigender Wirkstoffdosierung deutlich zu.

Nach Chlortetracyclinmarkierung kann auch in den Tibien der Sr- und EHDP-Gruppen eine Fluoreszenz erkannt werden, die sogar bei den Sr-Gruppen meist stärker als bei den vergleichbaren Ca-Gruppen ausgeprägt ist. Im Gegensatz zu T. flavescens ist bei verschiedener Vitamin D₃-Dosierung kein Fluoreszenzunterschied sichtbar. Bei den Sr- und EHDP-Gruppen ist jedoch mit einem höheren Goldhaferanteil auch eine Fluoreszenzsteigerung zu erzielen.

6. Diskussion

6.1. Gesamtergebnis des biologischen Vergleiches von Goldhafer, Vitamin D₃ und 1,25(OH)₂D₃

Bei allen Küken, denen nach der Vitamin D₃-freien Depletionsperiode Goldhafer oder ein Extrakt desselben gefüttert wurde, war die antirachitische Wirkung dieser Pflanze sichtbar. In ihrem physiologischen Verhalten, dem Futterverzehr und der Gewichtszunahme glichen diese Tiere anderen Kükengruppen, denen Vitamin D₃ oder 1,25(OH)₂D₃ verabreicht wurde. Auch der Calcium- und anorganische Phosphorgehalt des Serums, die Ergebnisse der Knochenuntersuchungen und der Anteil des Calcium-bindenden Proteins (CaBP) in der Dünndarmmukosa rechtfertigen diesen Schluß.

Neben diesen qualitativen Vergleichen ist auch eine quantitative Gegenüberstellung der biologischen Goldhafer- und Vitamin D₃-Aktivität möglich. Im Versuch VI zeigen sich 15 % Goldhaferextrakt bezüglich des CaBP-Anteils nicht ganz so wirksam wie 600 I.E. Vitamin D₃/kg. Auch 30 % Goldhafer sind im Versuch V und VI etwas weniger aktiv als 1200 I.E. Vitamin D₃/kg. Ein Vergleich der Knochenasche im ersten Versuch zwischen den Ca-Gruppen mit 15 % Goldhafer oder 600 I.E. Vitamin D₃/kg unterstützt diese Feststellung ebenfalls. Aus diesen verschiedenen Konzentrationen läßt sich für den verwendeten Goldhafer eine Aktivität von etwa 3000 I.E. Vitamin D₃-Äquivalenten/kg Trockensubstanz annehmen. Dieses Ergebnis stimmt gut mit der am Eischalen-Wachstest gefundenen Goldhaferaktivität überein (GROPP J., 1974) und steht im groben Widerspruch zu KÖHLER et al. (1978), die im Trisetum eine Aktivität von 22000 I.E./kg Trockensubstanz vermuten. Diese enorm hohe Aktivitäts-

angabe scheint jedoch auf eine falsche Interpretation der gefundenen Wachteileischalenergebnisse zurückzuführen zu sein.

Neben diesen Gemeinsamkeiten konnten mit Hilfe von Strontium- und EHDP-Hemmversuchen (siehe 2.3. und 2.4.) auch Wirkungsunterschiede von Trisetum und Vitamin D_3 einerseits und $1,25(OH)_2D_3$ andererseits gefunden werden. Da Strontiumgaben in den Nierenmitochondrien die Hydroxylierung von $25(OH)D_3$ zu $1,25(OH)_2D_3$ hemmen, wird die Vitamin D_3 -Wirkung auf den Organismus blockiert. Folglich kann kein CaBP mehr gebildet und kein Calcium absorbiert werden. Die Folgen sind rachitische Erscheinungen, die bei Küken von einer Hypocalcämie und einer Hyperphosphatämie begleitet werden (siehe 2.2.). Wird dagegen neben Strontium gleichzeitig $1,25(OH)_2D_3$ verabreicht, so wird die Strontiumblockade umgangen und Vitamin D-Mangelerscheinungen können nicht auftreten. Auch EHDP führt zu einer Beeinträchtigung der $1,25(OH)_2D_3$ -Synthese und hemmt somit die Knochenmineralisation und die intestinale Calciumabsorption.

Wie sich im Versuch I aus dem Vergleich der Gewichtszunahmen der Strontium-gehemmten Gruppen Ähnlichkeiten zwischen Vitamin D_3 und Goldhafer ableiten lassen, wird auch aus Versuch II und III ersichtlich, daß die Gewichtsabnahme und die Mortalität in der Sr-Gruppe mit $1,25(OH)_2D_3$ wesentlich größer ist als bei den vergleichbaren Küken mit Vitamin D_3 oder T. flavescens. Die Vitamin D_3 -artige Wirkung des Goldhafers wird in denjenigen Versuchen noch deutlicher, in denen die strontiumhaltigen Futterrationen zur Vermeidung eines Calciummangels noch 0,4 % Ca enthielten.

Im Versuch IV sind neben der Gewichtsentwicklung und dem klinischen Verhalten vor allem die Serumwerte für die Be-

urteilung der Trisetumwirkung von Bedeutung. Hier zeigen sich die Küken der Sr-Gruppe mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wesentlich lebhafter als die mit Goldhafer- oder Vitamin D_3 -Zusatz. Der Phosphorwert des Serums ist bei der erstgenannten Gruppe niedrig, während er bei den Sr-Gruppen mit Vitamin D_3 oder Goldhafer signifikant höher liegt. Diese bei Rachitis bekannte Hyperphosphatämie deutet auf eine Hemmung der Vitamin D_3 - und Goldhaferwirkung hin und wird im Versuch V auch bei der Hemmung mit EHDP ersichtlich. Hier liegt wiederum der Phosphorspiegel in den Strontium- oder EHDP-gehemmten Gruppen mit Trisetum oder Vitamin D_3 signifikant höher als bei den entsprechenden Küken mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und spricht somit für die biologische Ähnlichkeit von Vitamin D_3 und Goldhafer.

Ab Versuch V wird zusätzlich noch der CaBP-Gehalt der Dünndarmmukosa bestimmt. Dabei reduziert Strontium oder EHDP den sonst bei Goldhafer- oder Vitamin D_3 -Gabe hohen CaBP-Wert. Wird jedoch den Küken $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verabreicht, tritt diese enorme Abnahme des CaBP nicht in Erscheinung. Auch im Versuch VI ist am hohen Serumphosphor und am geringen CaBP-Anteil eine Gemeinsamkeit der Trisetum- und Vitamin D_3 -Wirkung erkennbar.

In allen Versuchen konnte somit gezeigt werden, daß die kalzinogene Aktivität von *T. flavescens* einer Vitamin D_3 -ähnlichen Wirkung gleicht und sich damit von $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ unterscheidet.

Aus dem ähnlichen Verhalten von *T. flavescens* und Vitamin D_3 darf jedoch nicht gefolgert werden, daß im Trisetum tatsächlich Cholecalciferol als aktives Prinzip vorliegt; denn einige Ergebnisse des biologischen Ver-

gleiches lassen auch Wirkungsunterschiede zwischen beiden Substanzen erkennen.

So wird aus den Knochenbefunden der Sr-gefütterten Küken im Versuch I nach der zweiten Versuchswoche mit oder ohne Vitamin D_3 eine signifikante Abnahme des Tibia-Aschegehaltes deutlich, die auch schon von anderen Autoren bei Ratten- und Kükenversuchen beobachtet wurde (SCHMID A., 1961; CORRADINO et al., 1971 a). Bei *T. flavescens* oder $1,25(OH)_2D_3$ in der Ration tritt dieser Rückgang nicht auf.

Dieser Unterschied könnte sogar als eine Ähnlichkeit zwischen Goldhafer und $1,25(OH)_2D_3$ gedeutet werden. Doch steht dieser Annahme der enorm hohe Strontiumgehalt des Serums bei $1,25(OH)_2D_3$ -Gabe und der niedrige nach Trisetumfütterung im Versuch V entgegen.

Vergleicht man im ersten Versuch die relativen Calciumgehalte der Tibien bei den Ca-Gruppen mit Trisetum oder Vitamin D_3 , so fällt nach der zweiten Versuchswoche nur bei den Küken mit Goldhafer ein signifikanter Anstieg des Calciumgehaltes auf. Dies könnte auf eine Verschiebung des Ca/P-Verhältnisses hindeuten und die kalzinogene Aktivität des Goldhafers erklären. Jedoch wurde eine ähnliche Zunahme des relativen Calciumgehaltes der Knochenasche von DIRKSEN et al. (1970) bei an Kalzinose erkrankten Rindern nicht gefunden.

Dieser Anstieg des Ca/P-Verhältnisses konnte schon bei wachsenden Ratten und Küken beobachtet werden (SZYMENDERA J., 1970; PELLEGRINO and BILTZ, 1972) und wird von den Autoren mit einer Abnahme der amorphen und einer Zunahme der kristallinen Phase des anorganischen Knorpelgewebes erklärt. Da genaue Kenntnisse über die Vorgänge im mineralisierten Gewebe noch nicht vorliegen (URIST M. R., 1976), existieren unterschiedliche Hypo-

thesen, die beispielsweise auf verschiedenen physikalisch-chemischen Bindungen mit der organischen Matrix oder auf dem Vorhandensein eines Calciummangel-Apatits beruhen (PRITCHARD J. J., 1972; ELLIOT J. C., 1973).

Die in den sechs Kükenversuchen gefundenen Ergebnisse zeigen eindeutig, daß der kalzinogene Trisetumfaktor einem Vitamin D_3 -artigen Effekt zuzuordnen ist und im biologischen Test keine Ähnlichkeit mit $1,25(OH)_2D_3$ aufweist. Damit stimmen die hier gezeigten Resultate mit den analytischen Arbeiten von RAMBECK und ZUCKER (1978) überein und lassen einen deutlichen Widerspruch zu der von PETERLIK et al. (1977 a; 1977 b) vertretenen Meinung erkennen.

6.2. Eignung der Serumwerte als Nachweis der Strontium- oder EHDP-Hemmung

In allen Broilerversuchen ist bei einem Vergleich der Ca-Gruppen mit den entsprechenden Sr- oder EHDP-Gruppen ein deutlich höherer anorganischer Serum-Phosphorwert bei den gehemmten Küken ersichtlich, wenn Vitamin D_3 , Goldhafer oder kein Wirkstoff verabreicht wird. Daß diese hohe Phosphorkonzentration typisch ist für den rachitischen Zustand der Küken, wird durch die gefundenen niedrigen CaBP-Werte der Dünndarmmukosa bestätigt. Umgekehrt gehen geringe Phosphorwerte mit einem hohen Gehalt an Calcium-bindendem Protein einher.

Im Gegensatz zum Serumphosphor scheinen die Calciumwerte für eine Aussage über die Trisetumaktivität nicht geeignet zu sein. Denn in allen Versuchen ist bei einem Vergleich der entsprechenden Ca- und Sr-Gruppen ein deutliches Absinken der Calciumkonzentrationen bei den gehemmten Küken auffällig, und zwar unabhängig davon, ob

Trisetum, Vitamin D_3 oder $1,25(OH)_2D_3$ verabreicht werden. Auch bei einer EHDP-Hemmung können mit den Calciumwerten keine Aktivitätsunterschiede festgestellt werden. Der Calciumspiegel der EHDP-gehemmten Küken unterscheidet sich kaum von dem der ungehemmten, zum Teil ist er sogar noch höher als bei den Vergleichsküken, wie es auch von BAXTER et al. (1974) beschrieben wurde.

In den Broilerversuchen ist deutlich zu erkennen, daß bei rachitischen Erscheinungen der anorganische Serumphosphor signifikant ansteigt und somit als Parameter der Strontium- oder EHDP-Hemmung geeignet ist. Damit kann in Zukunft bei ähnlichen Hemmversuchen auf die Bestimmung des CaBP-Gehaltes der Dünndarmmukosa verzichtet werden, zumal deren Durchführung komplizierter und zeitaufwendiger ist.

6.3. Eignung von Strontium und EHDP in Kükenversuchen zur Untersuchung der Trisetumaktivität

In den Versuchen I bis III zeigten die Strontium-gefütterten Küken Bewegungsstörungen, verminderte Freßlust, schlechte Gewichtszunahmen und hohe Mortalitätsraten. Diese Symptome wurden besonders deutlich, wenn neben Strontium auch $1,25(OH)_2D_3$ mit der Diät verabreicht wurde. Signifikant höhere Sterberaten und eine enorme Gewichtsabnahme waren im Versuch II und III die Folge. Auch auf rachitische Erscheinungen hindeutende Serumwerte konnten gefunden werden, obwohl nach den Literaturangaben $1,25(OH)_2D_3$ die durch Strontium induzierte Hemmung der Nierenhydroxylierung überwinden soll (siehe 2.3.). Diese geschilderten toxischen Effekte, die in unseren Versuchen sehr störten, wurden schon bei Ver-

suchen mit Schweinen beschrieben (BARTLEY and REBER, 1961). Auch hier zeigten sich, besonders bei Calciummangel in der Nahrung, diese Symptome. Außerdem soll Strontium die Bronchialmuskulatur kontrahieren und zum Tode durch Atem- und Herzstillstand führen (HAPKE H. J., 1975). Auch bei den Strontium-gefütterten Küken konnte, soweit sie beobachtet wurden, ein plötzliches Sterben unter Atemnot im Versuch II und III festgestellt werden.

Für die signifikante Gewichtsabnahme und Mortalität der Sr-Küken mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Diät gibt es eine einleuchtende Erklärung. Wird bei absolutem Calciummangel Strontium verabreicht, so wird dieses an Stelle des Calciums vermehrt vom CaBP gebunden (INGERSOLL and WASSERMAN, 1971), das trotz der Strontiumhemmung durch das zugeführte $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gebildet werden kann. Damit ist auch der hohe Strontiumspiegel des Serums der Gruppe 6 (Sr; $1,25\text{ D}_3$) im Versuch V erklärbar. Das resorbierte Strontium wird nun statt Calcium im Organismus eingebaut und führt zu den geschilderten Erscheinungen. Wird jedoch nicht, wie zumeist üblich, das gesamte Calcium durch Strontium ersetzt (z. B. 0,4 % Restcalcium im strontiumhaltigen Futter im Versuch IV, V und VI), tritt dieser toxische Effekt mehr in den Hintergrund. Dabei bleibt jedoch die erwünschte Hemmwirkung von Strontium auf die Hydroxylierung in der Niere erhalten. Diese Doppelwirkung des Strontiums kann also durch eine günstige Diätwahl so gesteuert werden, daß Hemmversuche mit Strontium zum gewünschten Ziel führen.

Auch EHDP ist geeignet, bei Broilern zu einer Beeinträchtigung der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese zu führen. Dies konnte in den Versuchen V und VI am hohen Serumphosphor und geringen CaBP-Anteil gezeigt werden. Doch waren die verabreichten Konzentrationen (5 mg EHDP tgl. s.c.) bei den Broilern nicht ausreichend, um die Kno-

chenmineralisation vollständig zu hemmen, wie dies an der noch sichtbaren Fluoreszenz nach Chlortetracyclinmarkierung im Versuch VI ersichtlich wurde. Auch bei Rattenversuchen erwiesen sich diese Konzentrationen als zu gering (SCHENK et al., 1973). Wird im Versuch V der CaBP-Gehalt der Sr-Küken mit dem der entsprechenden EHDP-Küken verglichen, so fällt bei der EHDP-Hemmung ein etwas höherer Anteil des CaBP am Gesamtprotein auf. Auch die guten Gewichtszunahmen der EHDP-Küken lassen sich mit einer etwas zu geringen Dosierung des EHDP erklären (BAR and HURWITZ, 1973). Mit einer entsprechend höheren Konzentration an EHDP können wahrscheinlich die gleichen Hemmerfolge in der Knochenmineralisation und im CaBP-Gehalt erzielt werden, wie dies mit Strontium der Fall ist.

6.4. Vergleichende Beurteilung von Broiler- und Leghornküken

Wie die Versuche IV, V und VI zeigen, sind Broilerküken durchaus geeignet, die Hemmbarkeit der Vitamin D₃- oder Trisetumaktivität nachzuweisen. Schon 10 Tage einer Vitamin D-Mangelernährung genügen, um rachitische Erscheinungen deutlich werden zu lassen.

Nach anschließenden 5 Versuchstagen mit verschiedenen Diäten können signifikante Unterschiede der Serum-Phosphorwerte und der CaBP-Anteile in der Dünndarmmukosa festgestellt werden.

Bei den Leghornküken waren nach 3wöchiger Vitamin D₃-freier Depletionsperiode keine rachitischen Erscheinungen feststellbar. Dies ist vermutlich auf ihren im Vergleich zu Broilern geringeren Calciumumsatz zurück-

zuführen.

Im Gegensatz zu den Broilerversuchen ließen sich während der Versuchsperiode bei Leghornküken (Versuch III) keine signifikanten Unterschiede im Serumphosphor zwischen den Ca- und Sr-Gruppen mit Vitamin D₃ oder Goldhafer erkennen. Auffallend war der statistisch gesichert niedrigere Phosphorspiegel der rachitischen Ca-Gruppen gegenüber allen anderen Gruppen.

Bei der gewählten Versuchsanordnung hat sich gezeigt, daß Leghornküken nicht geeignet sind, mit Hilfe des anorganischen Phosphorwertes das aktive Prinzip im Goldhafer zu charakterisieren.

6.5. Aussagekraft der Chlortetracyclinmarkierung

Da bei der Chlortetracyclinmarkierung nur makroskopische Untersuchungsergebnisse vorliegen, können aus den Fluoreszenzvergleichen der einzelnen Gruppen nur wenig Schlüsse gezogen werden. Auffallend ist, daß die Knochen der Strontium-gehemmten Küken in den meisten Fällen stärker fluoreszieren als die der ungehemmten Tiere. Dies überrascht auf den ersten Blick, da Strontium bekanntlich die Kalzifizierung des Knochens hemmt und folglich keine Fluoreszenz bei gleichzeitiger Tetracyclingabe auftreten dürfte. Das trotzdem deutlich sichtbare Leuchten ist nur durch eine Verbindung zwischen Chlortetracyclinmolekülen und eingelagertem Strontium erklärbar.

Auch bei den EHDP-Gruppen tritt in den Tibien eine Fluoreszenz auf, die jedoch schwächer ist als bei den Kontrollküken. Da EHDP ebenfalls die Knochenmineralisation hemmt, war vermutlich die gewählte Dosierung (5 mg EHDP tgl. s.c.) zu gering, um die Calciumein-

lagerung vollständig zu verhindern. Ähnliche Ergebnisse konnten schon bei Rattenversuchen festgestellt werden (SCHENK et al., 1973).

7. Zusammenfassung

Da über den Charakter des kalzinogenen Faktors im Goldhafer (*Trisetum flavescens*) widersprüchliche Auffassungen bestehen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Frage geprüft, ob die Trisetumaktivität einem Vitamin D_3 -artigen oder einem $1,25(OH)_2D_3$ -ähnlichen Effekt zuzuordnen ist. Dazu dienten Kükenversuche, in denen nach einer einheitlichen Vitamin D_3 -freien Depletionsperiode Diäten mit Goldhafer, Vitamin D_3 oder $1,25(OH)_2D_3$ in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt wurden.

Schon nach wenigen Versuchstagen war aus der Gewichtsentwicklung, dem Futterverzehr und den Serum- und Knochenwerten der Versuchstiere ersichtlich, daß *T. flavescens* ebenso antirachitisch wie Vitamin D_3 oder $1,25-(OH)_2D_3$ wirkte.

Nach quantitativen Aktivitätsvergleichen ließ sich im verwendeten Goldhafer etwa 3000 I.E. Vitamin D_3 -Aktivität/kg Trockensubstanz feststellen.

Um Unterschiede im Wirkungsmechanismus dieser aktiven Wirkstoffe erkennen zu können, wurde anderen Kükengruppen während der Versuchsdauer zusätzlich Strontium oder EHDP (Äthan-1-Hydroxy-1,1-Diphosphonat) verabreicht.

Von diesen Substanzen ist bekannt, daß sie durch eine Hemmung der $1,25(OH)_2D_3$ -Synthese in der Niere die Wirkung des Vitamin D_3 auf die Calciumabsorption unterdrücken, den antirachitischen Effekt von verabreichtem $1,25(OH)_2D_3$ jedoch nicht beeinflussen.

Für den Nachweis einer unterschiedlichen Hemmbarkeit der aktiven Wirkstoffe erwies sich neben dem $1,25(OH)_2D_3$ -abhängigen Calcium-bindenden Protein (CaBP) in der Dünndarmmukosa auch der anorganische Serumphosphor als geeignet, der bekanntlich bei rachitischen Küken deutlich ansteigt.

An diesen Parametern konnte eindeutig gezeigt werden, daß das aktive Prinzip des Goldhafers einem ähnlichen Metabolisierungsschritt unterliegen muß wie Vitamin D_3 . Denn der antirachitische Effekt von *T. flavescens* und Vitamin D_3 wurde durch Strontium oder EHDP gehemmt. Dagegen blieb verabreichtes $1,25(OH)_2D_3$ trotz Gegenwart der Hemmsubstanzen biologisch aktiv und verhinderte dadurch rachitische Erscheinungen der Küken.

Damit konnte für Goldhafer erstmalig auch in biologischen Versuchen ein deutlicher Unterschied zu $1,25(OH)_2D_3$ sowie eine Ähnlichkeit mit Vitamin D_3 dargestellt werden.

Unterschiede zwischen Vitamin D_3 und Goldhafer ergaben sich bei den strontiumhaltigen Diäten. Bei ähnlich hoher Konzentration an "Vitamin D_3 -Aktivität" waren die Strontiumspiegel des Serums bei Verabreichung von Goldhafer deutlich niedriger als bei Verabreichung von Vitamin D_3 .

Für diese Untersuchungen waren schnell wachsende Broilerküken geeigneter als Leghornküken. Jedoch mußte bei der Hemmung mit Strontium darauf geachtet werden, daß durch eine Mindestcalciumkonzentration in der Diät die toxischen Nebeneffekte des Strontiums vermindert wurden, die besonders in Gegenwart des $1,25(OH)_2D_3$ deutlich in Erscheinung traten.

8. Summary

(Comparative studies of *Trisetum flavescens*, cholecalciferol and 1.25-dihydroxycholecalciferol in chicks.)

Since there are contradictory views on the character of the calcinogenic factor in yellow oat-grass (*Trisetum flavescens*) the question of whether the *Trisetum* activity is to be attributed to a cholecalciferol-like effect or to a effect similar to $1.25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ has been examined in this thesis. This was done by carrying out experiments on chicks in which, following a uniform depletion period without cholecalciferol, diets containing yellow oat-grass, cholecalciferol or $1.25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ were fed in varying concentrations.

After the experiment had been running for only a few days it was obvious from the growth development, food consumption and the serum and bone values of the test animals that *T. flavescens* had the same antirachitic effect as cholecalciferol or $1.25-(\text{OH})_2\text{D}_3$.

When quantitative comparisons of the activity had been made it was possible to ascertain about 3000 I.U. of cholecalciferol activity per kg of dry substance in the yellow oat-grass that was being used.

So that it was possible to recognise differences in the mode of action of these active substances, other groups of chicks were also given strontium or EHDP (ethane-1-hydroxy-1.1-diphosphonate) during the course of the experiment. It is known that these substances, by inhibiting the synthesis of $1.25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ in the kidneys, suppress the effect of cholecalciferol on calcium absorption, but do not influence the antirachitic effect of $1.25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ fed to the chicks.

To provide evidence of the varying degree to which the

active substances can be inhibited the inorganic serum phosphorus proved suitable, which is known to undergo a marked increase in rachitic chicks, in addition to the calcium-binding protein (CaBP) dependant on $1.25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ in the mucous membrane of the small intestine.

These parameters clearly showed that the active principle of the yellow oat-grass must be subject to a similar metabolism phase as cholecalciferol, since the anti-rachitic effect of *T. flavescens* and cholecalciferol was inhibited by strontium or EHDP. On the other hand, $1.25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ fed to the chicks remained biologically active in spite of the presence of the inhibiting substances and thus prevented the chicks from appearing rachitic.

In this way it was possible for the first time in biological experiments to show for yellow oat-grass a clear difference to $1.25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ and a similarity to cholecalciferol.

Differences between cholecalciferol and yellow oat-grass resulted from the diets containing strontium. With a similar high concentration of "cholecalciferol activity" the strontium level of the serum was clearly lower when yellow oat-grass was fed than when cholecalciferol was fed.

For these experiments fast-growing broiler chicks were more suitable than Leghorn chicks. However, care had to be taken in the strontium experiments that calcium was not replaced totally by strontium. That clearly reduced the toxic effects of strontium, which were clearly apparent, especially in the presence of $1.25-(\text{OH})_2\text{D}_3$.

9. Literaturverzeichnis

- Bar, A. and S. Hurwitz (1973)
Bone ash and duodenal calcium-binding protein in
chicks treated with EHDP.
Poultry Sci. 52, 2338-2339
- Bartley, J. C. and E. F. Reber (1961)
Toxic effects of stable strontium in young pigs.
J. Nutr. 75, 21-28
- Bates, R. F. L., A. D. Care and D. Gonda (1974)
Stimulation of calcitonin secretion by strontium.
J. Physiol. 238, 76 P-78 P
- Bauer, G. L. H., A. Carlsson and B. Lindquist (1955)
A comparative study on the metabolism of Sr^{90} and
 Ca^{45} .
Acta Physiol. Scand. 35, 56-66
- Baxter, L. A., H. F. DeLuca, J.-P. Bonjour and H. A.
Fleisch (1974)
Inhibition of vitamin D metabolism by ethane-1-
-hydroxy-1,1-diphosphonate.
Arch. Biochem. Biophys. 164, 655-662
- Baxter, L. A. and H. F. DeLuca (1976)
Stimulation of 25-hydroxyvitamin D_3 -1 α -hydroxylase
by phosphate depletion.
J. Biol. Chem. 251, 3158-3161
- Bhattacharyya, M. H. and H. F. DeLuca (1974)
Subcellular location of rat liver calciferol-25-
hydroxylase.
Arch. Biochem. Biophys. 160, 58-62

- Blunt, J. W., H. F. DeLuca and H. K. Schnoes (1968)
25-hydroxycholecalciferol. A biologically active
metabolite of vitamin D₃.
Biochemistry 7, 3317-3322
- Blunt, J. W. and H. F. DeLuca (1969)
The synthesis of 25-hydroxycholecalciferol. A bio-
logically active metabolite of vitamin D₃.
Biochemistry 8, 671-674
- Bonjour, J.-P., H. F. DeLuca, H. Fleisch, U. Trechsel,
L. A. Matejowec and J. L. Omdahl (1973)
Reversal of the EHDP inhibition of calcium absorp-
tion by 1,25-dihydroxycholecalciferol.
Europ. J. clin. Invest. 3, 44-48
- Bonjour, J.-P., U. Trechsel, H. Fleisch, R. Schenk,
H. F. DeLuca and L. A. Baxter (1975)
Action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and a diphos-
phonate on calcium metabolism in rats.
Am. J. Physiol. 229, 402-408
- Bonjour, J.-P., H. Fleisch and U. Trechsel (1977)
Calcium absorption in diphosphonate-treated rats:
effect of parathyroid function, dietary calcium
and phosphorus.
J. Physiol. 264, 125-139
- Borle, A. B. (1974)
Calcium and phosphate metabolism.
Am. Rev. Physiol. 36, 361-390

- Boyle, I. T., R. W. Gray and H. F. DeLuca (1971)
Regulation by calcium of in vivo synthesis of 1,25-dihydroxycholecalciferol and 21,25-dihydroxycholecalciferol.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 2131-2134
- Boyle, I. T., J. L. Omdahl, R. W. Gray and H. F. DeLuca (1973)
The biological activity and metabolism of 24,25-dihydroxyvitamin D₃.
J. Biol. Chem. 248, 4174-4180
- Brickman, A. S., J. Jowsey, D. J. Sherrard, G. Friedman, F. R. Singer, D. J. Baylink, N. Maloney, S. G. Massry, A. W. Norman and J. W. Coburn (1975)
Therapy with 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ in the management of renal osteodystrophy.
In A. W. Norman, K. Schaefer, H.-G. Grigoleit, D. v. Herrath and E. Ritz
Vitamin D and problems related to uremic bone disease, S. 241-247
Walter de Gruyter - Berlin - New York
- Capen, C. C., C. R. Cole and J. W. Hibbs (1966)
The pathology of hypervitaminosis in cattle.
Path. vet. 2, 350-378
- Care A. D., R. F. L. Bates, R. Swaminathan, C. G. Scanes, M. Peacock, E. B. Mawer, C. M. Taylor, H. F. DeLuca, S. Tomlinson and J. L. H. Oriordan (1975)
The control of parathyroid hormone and calcitonin secretion and their interaction with other endocrine systems.
In R. V. Talmage, M. Owen and J. A. Parsons
Calcium-regulating hormones, S. 100-110
Proc. V. Parathyroid Conf. 1974, Oxford

- Carlsson, A., M. Lindquist and T. Magnusson (1952)
Tracer experiments on the effect of vitamin D on
the skeletal metabolism of calcium and phosphorus.
Acta Physiol. Scand. 26, 212-220
- Carlsson, A. (1954)
The effect of vitamin D on the absorption of inorganic phosphate.
Acta Physiol. Scand. 31, 301-307
- Chen, Ph. S., JR. and H. B. Bosmann (1964)
Effect of vitamins D₂ and D₃ on serum calcium and phosphorus in rachitic chicks.
J. Nutr. 83, 133-139
- Colston, K. W., J. M. A. Evans, T. C. Spelsberg and I. MacIntyre (1977)
Feedback regulation of vitamin D metabolism by 1,25-dihydroxycholecalciferol.
Biochem. J. 164, 83-89
- Comar, C. L. and R. H. Wasserman (1964)
Strontium
In C. L. Comar and F. Bronner
Mineral metabolism, Vol. II, Part A, S. 523-572
Academic Press - New York and London
- Corradino, R. A. and R. H. Wasserman (1970)
Strontium inhibition of vitamin D₃-induced calcium-binding protein (CaBP) and calcium absorption in chick intestine.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133, 960-963

Corradino, R. A., J. G. Ebel, P. H. Craig, A. N. Taylor
and R. H. Wasserman (1971 a)

Calcium absorption and the vitamin D₃-dependent
calcium-binding protein. I. Inhibition by dietary
strontium.

Calc. Tiss. Res. 7, 81-92

Corradino, R. A., J. G. Ebel, P. H. Craig, A. N. Taylor
and R. H. Wasserman (1971 b)

Calcium absorption and the vitamin D₃-dependent
calcium-binding protein. II. Recovery from dietary
strontium inhibition.

Calc. Tiss. Res. 7, 93-102

Corradino, R. A. (1973)

Embryonic chick intestine in organ culture.

J. Cell. Biol. 58, 64-78

Dämmrich, K., G. Dirksen und P. Plank (1970)

Über eine enzootische "Kalzinose" beim Rind

3. Skelettveränderungen.

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 77, 342-346

Deeb, S. and H.-J. Herrmann (1974)

Tetracycline-labelling as a method for detecting
the bone demineralization of parathormone-treated
rats.

Acta histochem. 50, 35-42

DeLuca, H. F. (1974)

Vitamin D: the vitamin and the hormone.

Federation Proc. 33, 2211-2219

Döbereiner, J., S. H. Done and L.E. Beltran (1975)

Experimental Solanum malacoxylon poisoning in calves.

Brit. vet. J. 131, 175-185

Dirksen, G. (1969)

Neuere Beobachtungen und Entwicklungen auf dem Gebiet der Stoffwechselstörungen der Hochleistungskuh.

In Tagungsbericht der "Schaumann-Stiftung zur Förderung der Agrarwissenschaften", S. 55-64

Dirksen, G., P. Plank, A. Spieß, T. Hänichen und

K. Dämmrich (1970)

Über eine enzootische "Kalzinose" beim Rind

1. Klinische Beobachtungen und Untersuchungen.

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 77, 321-338

Dirksen, G., P. Plank, T. Hänichen, K. Dämmrich und

A. Spieß (1971)

Über eine enzootische "Kalzinose" beim Rind

4. Untersuchungen an Schafen mit selektiver Verfütterung von Klee, Gräsern oder Kräutern.

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 78, 9-12

Dirksen, G., P. Plank, T. Hänichen und A. Spieß (1972)

Über eine enzootische Kalzinose beim Rind

5. Experimentelle Untersuchungen an Kaninchen mit selektiver Verfütterung von Knautgras (*Dactylis glomerata*), Goldhafer (*Trisetum flavescens*) und einem Gräsergemisch.

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 79, 77-79

- Dirksen, G., P. Plank, T. Hänichen und A. Spieß (1973)
Über eine enzootische Kalzinose beim Rind
VI. Experimentelle Kalzinose beim Kaninchen durch
selektive Verfütterung von Goldhafer (*Trisetum
flavescens*).
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 80, 148-152
- Dirksen, G., P. Plank, U. Simon, T. Hänichen, P. Daniel
und A. Spieß (1974)
Über eine enzootische Kalzinose beim Rind
VII. Nachweis der kalzinogenen Wirkung von Gold-
hafer (*Trisetum flavescens* L. P. B.) beim Wieder-
käufer.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 81, 1-5
- Dirksen, G., P. Plank, U. Simon, T. Hänichen, P. Daniel
und A. Spieß (1975)
Über eine enzootische Kalzinose beim Rind
VIII. Untersuchungen über die mögliche Bedeutung
des Sonnenlichtes (UV-Strahlen) bei der Entste-
hung der Kalzinose sowie Nachweis der kalzinogenen
Wirkung von getrocknetem Goldhafer (*Trisetum fla-
vescens* L. P. B.).
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 82, 387-390
- Ebel, J. G., A. N. Taylor and R. H. Wasserman (1969)
Vitamin D-induced calcium-binding protein of
intestinal mucosa.
Am. J. Clin. Nutr. 22, 431-436
- Elliot, J. C. (1973)
The problems of the composition and structure
of the mineral components of the hard tissues.
Clin. Orthop. Related Res. 92, 313-345

- Emtage, J. S., D. E. M. Lawson and E. Kodicek (1973)
Vitamin D-induced synthesis of mRNA for calcium-binding protein.
Nature 246, 100-101
- Evans, J. M. A., K. W. Colston, L. Galante and I. MacIntyre (1975)
Feedback regulation of 25-hydroxycholecalciferol metabolism by vitamin D₃.
Clin. Sci. Mol. Med. 48, 227-230
- Feinblatt, J. D., L.-R. Tai and A. D. Kenny (1975)
Avian parathyroid glands in organ culture: secretion of parathyroid hormone and calcitonin.
Endo. 96, 282-288
- Fraser, D. R. and E. Kodicek (1970)
Unique biosynthesis by kidney of a biologically active vitamin D metabolite.
Nature 228, 764-766
- Fraser, D. R. and E. Kodicek (1973)
Regulation of 25-hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase activity in kidney by parathyroid hormone.
Nature New Biology 241, 163-166
- Frost, H. M. (1962)
Tetracycline labelling of bone and the zone of demarcation of osteoid seams.
Can. J. Biochem. Physiol. 40, 485-489
- Galante, L., K. W. Colston, S. J. MacAuley and I. MacIntyre (1972)
Effect of calcitonin on vitamin D metabolism.
Nature 238, 271-273

- Galente, L., K. W. Colston, J. M. A. Evans, P. G. H. Byfield, E. W. Matthews and I. MacIntyre (1973)
The regulation of vitamin D metabolism.
Nature 244, 438-440
- Gasser, A. B., D. B. Morgan, H. A. Fleisch and L. J. Richelle (1972)
The influence of two diphosphonates on calcium metabolism in the rat.
Clin. Sci. 43, 31-45
- Gonnerman, W. A., W. K. Ramp and S. U. Toverud (1975)
Vitamin D, dietary calcium and parathyroid hormone interactions in chicks.
Endo. 96, 275-281
- Gray, R., J. Boyle and H. F. DeLuca (1971)
Vitamin D metabolism: the role of kidney tissue.
Science 172, 1232-1234
- Gropp, J. (1974)
Private Mitteilung
- Guilland, D., U. Trechsel, J.-P. Bonjour and H. Fleisch (1975)
Stimulation of calcium absorption and apparent increased intestinal 1,25-dihydroxycholecalciferol in rats treated with low doses of ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate.
Clin. Sci. Mol. Med. 48, 157-160
- Hänichen, T., P. Plank und G. Dirksen (1970)
Über eine enzootische "Kalzinose" beim Rind
2. Histomorphologische Befunde an den Weichgeweben.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 77, 338-342

Hapke, H. J. (1975)

Teil V: Metalle

In H. J. Hapke

Toxikologie für Veterinärmediziner, S. 248-306

Ferdinand Enke Verlag Stuttgart

Hattner, R. S., L. P. Ilnicki and H. C. Hodge (1977)

The dose-response relationship of tetracycline to the detectability of labeled osteons by fluorescence microscopy.

In A. W. Norman, K. Schaefer, J. W. Coburn,

H. F. DeLuca, D. Fraser, H. G. Grigoleit and

D. v. Herrath

Vitamin D, biochemical, chemical and clinical

aspects related to calcium metabolism, S. 377-380

Walter de Gruyter - Berlin - New York

Haussler, M. R. (1975)

Vitamin D₃: Metabolism, mode of action and assay of circulating hormonal form.

In A. W. Norman, K. Schaefer, H.-G. Grigoleit,

D. v. Herrath and E. Ritz

Vitamin D and problems related to uremic bone disease, S. 25-42

Walter de Gruyter - Berlin - New York

Haussler, M. R., R. H. Wasserman, T. A. McCain, M. Peterlik, K. M. Bursac and M. R. Hughes (1976)

1,25-dihydroxyvitamin D₃-glycoside: identification

of a calcinogenic principle of Solanum malacoxylon. Life Sci. 18, 1049-1056

Hegsted, D. M., E. H. Stotz and R. Holab (1978)

Role of phosphate on vitamin D action in chick ileum organ culture.

Nutr. Rev. 36, 154-155

- Heinritz, K., G. Kragenings und T. Hänichen (1977)
Untersuchungen über die kalzinogene Aktivität
von siliertem Goldhafer (*Trisetum flavescens*
(L.) P. B.).
Z. Tierphysiol., Tierernährg. u. Futtermittelkde
39, 139-145
- Henry, H. L., A. W. Norman, A. N. Taylor, D. L. Harten-
bower and J. W. Coburn (1976)
Biological activity of 24,25-dihydroxycholecalciferol in chicks and rats.
J. Nutr. 106, 724-734
- Henry, H. L. and A. W. Norman (1978)
Vitamin D: two dihydroxylated metabolites are
required for normal chicken egg hatchability.
Science 201, 835-837
- Hill, L. F., G. A. Lumb, E. B. Mawer and S. W. Stanbury
(1973)
Indirect inhibition of the biosynthesis of 1,25-
dihydroxycholecalciferol in rats treated with a
diphosphonate.
Clin. Sci. 44, 335-347
- Holick, M. F., H. K. Schnoes, H. F. DeLuca, T. Suda and
R. J. Cousins (1971)
Isolation and identification of 1,25-dihydroxy-
cholecalciferol. A metabolite of vitamin D active
in intestine.
Biochem. 10, 2799-2804

- Holick, M. F., M. Garabedian and H. F. DeLuca (1972 a)
1,25 dihydroxycholecalciferol: metabolite of
vitamin D_3 active on bone in anephric rats.
Science 176, 1146-1147
- Holick, M. F., H. K. Schnoes, H. F. DeLuca, R. W. Gray,
I. T. Boyle and T. Suda (1972 b)
Isolation and identification of 24,25-dihydroxy-
cholecalciferol a metabolite of vitamin D_3 made
in the kidney.
Biochem. 11, 4251-4255
- Holick, M. F., A. Kleiner-Bossaller, H. K. Schnoes,
P. M. Kasten, I. T. Boyle and H. F. DeLuca (1973 a)
1,24,25-trihydroxyvitamin D_3 . A metabolite of
vitamin D_3 effective on intestine.
J. Biol. Chem. 248, 6691-6696
- Holick, M. F., E. J. Semmler, H. K. Schnoes and H. F. De-
Luca (1973 b)
 1α -hydroxy derivate of vitamin D_3 : a highly potent
analog of 1α , 25-dihydroxyvitamin D_3 .
Science 180, 190-191
- Horsting, M. and H. F. DeLuca (1969)
In vitro production of 25-hydroxycholecalciferol.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 251-256
- Hughes, M. R., T. A. McCain, S. Y. Chang and
M. R. Haussler (1977)
Presence of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 -glycoside in
the calcinogenic plant *Cestrum diurnum*.
Nature 268, 347-348

Hurwitz, S. and A. Bar (1970)

The site of calcium and phosphate absorption in the chick.

Poultry Sci. 49, 324-325

Ingersoll, R. J. and R. H. Wasserman (1971)

Vitamin D₃-induced calcium-binding protein.

J. Biol. Chem. 246, 2808-2814

Johnson, A. R., W. D. Armstrong and L. Singer (1968)

The incorporation and removal of large amounts of strontium by physiologic mechanism in mineralized tissues of the rat.

Calc. Tiss. Res. 2, 242-252

Johnson, A. R. (1973)

The influence of strontium on characteristic factors of bone.

Calc. Tiss. Res. 11, 215-221

Kment, A. (1976)

Endokrinium

In A. Scheunert und A. Trautmann

Lehrbuch der Veterinär-Physiologie, S. 33-90

Verlag Paul Parey - Berlin und Hamburg, 6. Aufl.

Köhler, H. und R. Libiseller (1970)

Über das Auftreten der sogenannten "Weidekrankheit" bei Kühen in Österreich im Zusammenhang mit der Düngung und Fütterung.

Zbl. Vet. Med. A 17, 289-337

- Köhler, H., J. Leibetseder, R. Libiseller, M. Skalicky
und R. Swoboda (1974)
Zur Kalzinose des Rindes
I. Untersuchungen zur Pathologie und zum Phosphor-
stoffwechsel mehrmals an Kalzinose erkrankter
Rinder.
Zbl. Vet. Med. A 21, 613-637
- Köhler, H. (1977)
Die Kalzinose des Rindes und der derzeitige Stand
ihrer Erforschung.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 84, 98-100
- Köhler, H., D.-S. Regal und M. Peterlik (1978)
Zur Kalzinose der Rinder in Österreich
VI. Nachweis einer 1,25-Dihydroxycholecalciferol-
artigen Substanz als Ursache der antirachitischen
Wirkung von Goldhafer (*Trisetum flavescens*) bei
Küken und Wachteln.
Zbl. Vet. Med. A 25, 253-270
- Kolata, G. B. (1975)
Vitamin D: investigation of a new steroid hor-
mone.
Science 187, 635-636
- Krook, L., R. H. Wasserman, J. N. Shively, A. H. Ta-
shjian, T. D. Brokken and J. F. Morton (1975 a)
Hypercalcemia and calcinosis in Florida horses:
implication of the shrub, *Cestrum diurnum*, as
the causative agent.
Cornell Vet. 65, 26-56
- Krook, L., R. H. Wasserman, K. Mcentee, T. D. Brokken
and M. B. Teigland (1975 b)
Cestrum diurnum poisoning in Florida cattle.
Cornell Vet. 65, 557-575

- Krut'ko, N. F. and Yu. Blinkov (1974)
Effect of regeneration of bone tissue in the
early stages by the tetracycline label method.
Bull. Exp. Biol. 77, 447-448
- Lawson, D. E. M., P. W. Wilson and E. Kodicek (1969)
Metabolism of vitamin D. A new cholecalciferol,
involving loss of hydrogen at C-1, in chick
intestinal nuclei.
Biochem. J. 115, 269-277
- Lawson, D. E. M., D. R. Fraser, E. Kodicek, H. R. Morris
and D. L. Williams (1971)
Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol,
a new kidney hormone controlling calcium meta-
bolism.
Nature 230, 228-230
- Libiseller, R. und P. Gunhold (1969)
Calcinosen bei Kühen.
Die Naturwissenschaften 56, S. 39
- Libiseller, R., E. Glawischnig, H. Köhler und R. Swo-
boda (1974)
Zur Kalzinose der Rinder in Österreich
II. Experimentelle Auslösung einer Kalzinose bei
Schafen und Kaninchen.
Zbl. Vet. Med. A 21, 705-730
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and
R. J. Randall (1951)
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275

- Milch, R. A., D. P. Rall and J. F. Tobie (1958)
Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone.
J. Bone Jt. Surg. 40 A, 897-910
- Morgan, D. B., J.-P. Bonjour, A. B. Gasser, K. O'Brien
and H. Fleisch (1971)
The influence of a diphosphonate on the intestine
absorption of calcium.
Israel J. Med. Sci. 7, 384-386
- Nickel, R., A. Schummer und E. Seiferle (1973)
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band V, S. 101
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
- Nitsche, H. (1978)
Private Mitteilung, Diss. in Vorbereitung
- Norman, A. W. and H. Henry (1974)
1,25-dihydroxycholecalciferol - a hormonally
active form of vitamin D₃.
Rec. Prog. Horm. Res. 30, 431-480
- Omdahl, J. L. and H. F. DeLuca (1971)
Strontium induced rickets: metabolic basis.
Science 174, 949-951
- Omdahl, J. L. and H. F. DeLuca (1972)
Rachitogenic activity of dietary strontium.
I. Inhibition of intestinal calcium absorption
and 1,25-dihydroxycholecalciferol synthesis.
J. Biol. Chem. 247, 5520-5526

- Omdahl, J. L. and H. F. DeLuca (1977)
Mediation of calcium adaptation by 1,25-dihydroxy-cholecalciferol.
J. Nutr. 107, 1975-1980
- Omdahl, J. L. and A. P. Evan (1977)
Kidney mitochondrial metabolism of 25-hydroxy-vitamin D₃.
Arch. Biochem. Biophys. 184, 179-188
- Omdahl, J. L., L. A. Hunsacker and V. A. Aschenbrenner (1977)
Control of kidney 25-hydroxyvitamin D₃ metabolism.
Arch. Biochem. Biophys. 184, 172-178
- Pellegrino, E. D. and R. M. Biltz (1972)
Mineralization in the chick embryo.
Calc. Tiss. Res. 10, 128-135
- Pento, J. T., S. M. Glick, A. Kagan and P. C. Gorfein (1974)
The relative influence of calcium, strontium and magnesium on calcitonin secretion in the pig.
Endo. 94, 1176-1180
- Peterlik, M., K. Bursac, M. R. Haussler, M. R. Hughes and R. H. Wasserman (1976)
Further evidence for the 1,25-dihydroxyvitamin D-like activity of Solanum malacoxylon.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 797-804

- Peterlik, M., D.-S. Regal and H. Köhler (1977 a)
Evidence for a 1,25-dihydroxyvitamin D-like activity in *Trisetum flavescens*: possible cause for calcinosis in grazing animals.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 775-781
- Peterlik, M., D.-S. Regal und H. Köhler (1977 b)
Eine 1,25-Dihydroxyvitamin-D-artige Substanz als Ursache der kalzinogenen Wirkung des Goldhafers.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 84, 253-255
- Peterlik, M., and R. H. Wasserman (1978)
Effect of vitamin D on transepithelial phosphate transport in chick intestine.
Am. J. Physiol. 234, E 379-E 388
- Petrie, L. and R. G. Breeze (1977)
Hypervitaminosis D and metastatic pulmonary calcification in a cow.
The veterinary Record 101, 480-482
- Plank, P., T. Hänichen und G. Dirksen (1976)
Über eine enzootische Kalzinose beim Rind
IX. Untersuchungen über den Einfluß der Düngung auf die pathogene Wirkung von "Kalzinose-Weiden".
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 83, 159-161
- Ponchon, G. and H. F. DeLuca (1969)
Metabolites of vitamin D₃ and their biologic activity.
J. Nutr. 99, 157-167

- Ponchon, G., A. L. Kennan and H. F. DeLuca (1969)
"Activation" of vitamin D by the liver.
J. Clin. Invest. 48, 2032-2037
- Pritchard, J. J. (1972)
General histology of bone
In G. H. Bourne
The biochemistry and physiology of bone, Vol. I,
S. 1-20
Academic Press New York and London
- Rambeck, W. A. and H. Zucker (1978)
Non-identity of the steroid from *Trisetum flavescens* with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.
In Israel Soc. Calc. Tiss., Abstracts, S. 57
III. Int. Workshop on Calc. Tiss., Kiriat Anan-
vim, Israel
- Ramp, W. K., S. U. Toverud and W. A. Gonnerman (1974)
Effects of cholecalciferol on bone formation and
serum calcium, phosphate and magnesium in chicks.
J. Nutr. 104, 803-809
- Rasmussen, H., M. Wong, D. Bikle and D. B. P. Goodman
(1972)
Hormonal control of the renal conversion of
25-hydroxycholecalciferol to $1,25\text{-dihydroxycholecalciferol}$.
J. Clin. Invest. 51, 2502-2504
- Rizzoli, R., H. Fleisch and J.-P. Bonjour (1977)
Role of $1,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ on intestinal
phosphate absorption in rats with a normal vitamin
D supply.
J. Clin. Invest. 60, 639-647

Sachs, L. (1972)

Statistische Auswertungsmethoden

Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 3. Aufl.

Sachs, M., A. Bar, R. Cohen, Y. Mazur, E. Mayer and
S. Hurwitz (1977)

Use of 1α -hydroxycholecalciferol in the preven-
tion of bovine parturient paresis.

Am. J. Vet. Res. 38, 2039-2041

Schenk, R., W. A. Merz, R. Mühlbauer, R. G. G. Russel
and H. Fleisch (1973)

Effect of ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate
(EHDP) and dichloromethylene diphosphonate
(Cl₂MDP) on the calcification and resorption of
cartilage and bone in the tibial epiphysis and
metaphysis of rats.

Calc. Tiss. Res. 11, 196-214

Schmid, A. (1961)

Über Gesetzmäßigkeiten des Strontium-Stoff-
wechsels im Skelet und den Mechanismus der
"Fixierung" von Strontium im Knochensystem.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 326, 177-196

Simkiss, K. and C. G. Dacke (1971)

Ultimobranchial glands and calcitonin.

In D. J. Bell and B. M. Freeman

Physiology and biochemistry of the domestic
fowl, Vol. 1, S. 481-488

Academic Press - London - New York

Skinner, H. C. W. and J. Nalbandian (1975)

Tetracyclines and mineralized tissues: review
and prospects.

Yale J. Biol. Med. 48, 377-397

Sobel, A. E., A. R. Goldfarb and B. Kramer (1934)

Studies of incurable rickets. I. Respective
role of the local factor and vitamin D in
healing.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 31, 869-870

Sobel, A. E., J. Cohen and B. Kramer (1935)

CCCXII. The nature of the injury of the cal-
cifying mechanism in rickets due to strontium.

Biochem. J. 29, 2640-2645

Sommerville, B. A., R. Swaminathan and A. D. Care

(1978)

A comparison of the effects of dietary calcium
and phosphorus deficiency on the in vitro and
in vivo metabolism of 25-hydroxycholecalciferol
in the chick.

Br. J. Nutr. 39, 411-414

Spanos, E., K. W. Colston, J. M. S. Evan, L. S. Galente,

S. J. Macanley and I. MacIntyre (1976)

Effect of prolactin on vitamin D metabolism.

Mol. Cell. Endo. 5, 163-167

Stählin, A. (1969)

Grünfutter und Heu

In M. Becker und K. Nehring

Handbuch der Futtermittel, Bd. 1, S. 1-177

Verlag Paul Parey - Hamburg u. Berlin

- Steele, T. H., J. E. Engle, Y. Tanaka, R. S. Lorenc,
K. L. Dudgeon and H. F. DeLuca (1975)
Phosphatemic action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃.
Am. J. Physiol. 229, 489-495
- Sturkie, P. D. (1965)
Parathyroids, thymus, pineal and pancreas.
In P. D. Sturkie
Avian physiology, S. 649-667
Bailliére, Tindall and Cassell, London 2. Aufl.
- Szymendera, J. (1970)
Bone mineral metabolism in cancer.
In P. Rentchnick
Recent results in cancer research, 27, S. 1-12
Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York
- Tam, C. S., R. Reed and B. Cruickshank (1974)
Bone growth kinetics. Modifications of the tetra-
cycline labelling technique.
J. Path. 113, 27-39
- Tanaka, Y. and H. F. DeLuca (1973)
The control of 25-hydroxyvitamin D metabolism
by inorganic phosphorus.
Arch. Biochem. Biophys. 154, 566-574
- Tanaka, Y. and H. F. DeLuca (1974)
Role of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in maintaining
serum phosphorus and curing rickets.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 1040-1044

- Tanaka, Y., L. Castillo and H. F. DeLuca (1976)
Control of renal vitamin D hydroxylases in
birds by sex hormones.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 2701-2705
- Taylor, A. N. (1974)
In vitro phosphate transport in chick ileum:
effect of cholecalciferol, calcium, sodium and
metabolic inhibitors.
J. Nutr. 104, 489-494
- Taylor, C. M., E. B. Mawer and A. Reeve (1975)
The effects of a diphosphonate and dietary
calcium on the metabolism of vitamin D₃ (chole-
calciferol) in the chick.
Clin. Sci. Mol. Med. 49, 391-400
- Taylor, T. G. (1971)
The parathyroid glands.
In D. J. Bell and B. M. Freeman
Physiology and biochemistry of the domestic
fowl, Vol. 1, S. 473-480
Academic Press - London - New York
- Thorngren, K.-G. and L. J. Hansson (1974)
Bioassay of growth hormone and prolactin pre-
parations by determination of longitudinal bone
growth with tetracycline.
Acta Endo. 76, 35-52
- Thornton, P. A. (1974)
Phosphate as a mediator of hypocalcemic de-
velopment in chicks with low calcium intakes.
Nutr. Rep. Intern. 2, 183-190

- Toffolon, E. P., M. M. Pechet and K. Isselbacher (1975)
Demonstration of the rapid action of pure crystalline 1α -hydroxy vitamin D_3 and $1\alpha,25$ -dihydroxy vitamin D_3 on intestinal calcium uptake.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 229-230
- Trechsel, U., R. Schenk, J.-P. Bonjour, R. G. G. Russell and H. Fleisch (1977)
Relation between bone mineralization, Ca absorption, and plasma Ca in phosphonate-treated rats.
Am. J. Physiol. 232, E 298-E 305
- Urist, M. R. (1976)
Biochemistry of calcification
In G. H. Bourne
The biochemistry and physiology of bone. Vol. IV, S. 2-59
Academic Press New York, San Francisco, London
- Vanderhoeft, P. J., P. J. Kelly and L. F. A. Peterson (1962)
Determination of growth rates in canine bone by means of tetracycline-labeled patterns.
Lab. Invest. 11, 714-726
- Walling, M. W. and D. V. Kimberg (1975)
Calcium absorption by intestine. Stimulation in vitamin D-deficient nephrectomized rats by *Solanum glaucophyllum*.
Gastroenterology 69, 200-205

Wasserman, R. H. (1962)

Studies on vitamin D₃ and the intestinal absorption of calcium and other ions in the rachitic chick.

J. Nutr. 77, 69-80

Wasserman, R. H. (1963)

Vitamin D and the absorption of calcium and strontium in vivo.

In R. H. Wasserman

The transfer of calcium and strontium across biological membranes, S. 211-228

Academic Press New York

Wasserman, R. H., R. A. Corradino and A. N. Taylor (1968)

Vitamin D-dependent calcium-binding protein. Purification and some properties.

J. Biol. Chem. 243, 3978-3986

Wasserman, R. H. and A. N. Taylor (1973)

Intestinal absorption of phosphate in the chick: effect of vitamin D₃ and other parameters.

J. Nutr. 103, 586-599

Wasserman, R. H. (1974)

Calcium absorption and calcium-binding protein synthesis: Solanum malacoxylon reverses strontium inhibition.

Science 183, 1092-1094

- Wasserman, R. H., R. A. Corradino and L. P. Krook
(1975)
Cestrum diurnum: a domestic plant with 1,25-di-
hydroxycholecalciferol-like activity.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 62, 85-91
- Wasserman, R. H., L. Krook and G. Dirksen (1977)
Evidence for anti-rachitic activity in the cal-
cinogenic plant, Trisetum flavescence.
Cornell Vet. 67, 333-350
- Weber, C. W., A. R. Doberenz, R. W. G. Wyckoff and
B. L. Reid (1968)
Strontium metabolism in chicks.
Poultry Sci. 47, 1318-1323
- Winckler, J. and W. Westphal (1973)
Zur Spezifität des Calciumnachweises durch Tet-
racyclin.
Histochemie 33, 95-105
- Windaus, A., F. Schenk und F. v. Weder (1936)
Über das antirachitisch wirksame Bestrahlungs-
produkt aus 7-Dehydrocholesterin.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 241, 100-103
- Wolf, M. (1976)
Untersuchungen über die kalzinogene Aktivität
von Trisetum flavescens ((L.) P. B.) am Kanin-
chen.
Vet. Med. Diss., München

Wolf, M. und G. Dirksen (1976)

Über eine enzootische Kalzinose beim Rind.

X. Mitteilung: Untersuchungen über den Einfluß von *Trisetum flavescens* (L. P. B.) auf den Kalzium- und Phosphatspiegel im Blutplasma des Kaninchens.

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 83, 398-401

Worker, N. A. and B. J. Carrillo (1967)

"Enteque seco", calcification and wasting in grazing animals in the Argentine.

Nature 215, 72-74

Zerwekh, J. E., M. R. Haussler and T. J. Lindell (1974)

Rapid enhancement of chick intestinal DNA-dependent RNA polymerase II activity by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 , in vivo.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 2337-2341

Zucker, H., O. Kreutzberg and W. A. Rambeck (1977)

Vitamin D-like action of a steroid from *Trisetum flavescens*.

In A. W. Norman, K. Schaefer, J. W. Coburn, H. F. DeLuca, D. Fraser, H. G. Grigoleit and D. v. Herrath

Vitamin D, biochemical, chemical and clinical aspects related to calcium metabolism, S. 85-87

Walter de Gruyter - Berlin - New York

Herrn Prof. Dr. H. Zucker danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Ebenso danke ich Herrn Dr. W. Rambeck für die immer freundlich gewährte Hilfe und für viele wertvolle Hinweise.

Für die hilfsbereite Unterstützung bei den Versuchsauswertungen bedanke ich mich herzlich bei Frau O. Kreutzberg und Frau A. Wetzels.

Der Kollegin H. Stark und dem Kollegen U. Gelfert sei für die freiwillige Hilfe bei den Serumbestimmungen gedankt.

Mein besonderer Dank gilt dem Doktoranden H. Nitsche, dessen Ergebnisse ich zur Abrundung meiner Versuche verwenden durfte.

L e b e n s l a u f

Am 6. 12. 1949 wurde ich, Peter Christian Bittner, als zweiter Sohn des Ofenbaumeisters Friedrich Bittner und seiner Ehefrau Sofia, geb. Bauer, in Oettingen, Kreis Donau-Ries, geboren.

Nach sechs Volksschuljahren in Oettingen besuchte ich ab 1962 das Theodor-Heuss-Gymnasium in Nördlingen, das ich am 19. Juni 1971 mit dem Zeugnis der Reife verließ.

Von Juli 1971 bis Oktober 1972 leistete ich meine Wehrpflicht ab.

Ab November 1972 studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München Veterinärmedizin.

Nach Bestehen der Tierärztlichen Prüfung am 26. Oktober 1977 und Erhalt der Bestallung begann ich am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie im Fachbereich Tiermedizin der Universität München mit der Arbeit an meiner Dissertation. Von Januar bis Dezember 1978 war ich am gleichen Institut als wissenschaftliche Hilfskraft tätig.

Seit Juli 1976 bin ich mit der Zahnarzthelferin Reinilde Michel verheiratet.

